



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INTERACCIONES BIOLÓGICAS DE
BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS
USANDO COMO SUSTRATO LA YUCA O
CASSAVA *Manihot esculenta*, Crantz.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
JUAN CARLOS LANDEROS ALVARADO

Tutor: DR. SERGIO REVAH MOISEEV



MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTERACCIONES BIOLÓGICAS DE BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS UTILIZANDO COMO SUSTRATO LA YUCA O CASSAVA *Manihot esculenta*, Crantz.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Revah Moiseev en el Departamento de Ingeniería de Procesos Hidráulicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Amelia Farrés González-Sarabia	Facultad de Química, UNAM
Mtro. Pablo Pérez Gavilán	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Sergio Revah Moiseev	Depto de IPH de la UAMI

El proyecto fue apoyado parcialmente por la ORSTOM. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral esta constituido por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Sarabia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Miguel Ulloa Sosa	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. José Mariano García Garibay	Depto. de Alimentos UAMI
Suplente	Dr. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

CONTENIDO

Carátula.....
Reconocimientos	
Agradecimientos	
Índice	
Resumen	
Abreviaturas	
Introducción y/ o Antecedentes	
Planteamiento del Problema	
Hipótesis	
Objetivos	
Materiales y Métodos	
Resultados	
Discusión	
Conclusiones	
Perspectivas	
Referencias	
Anexos: Artículos publicados	

INDICE

	Pag.
Capitulo 1	
Introducción	1
1.1 Historia	1
1.2 Fermentaciones tradicionales	2
1.3 Fermentaciones cultivo mixtos	3
1.4 Rutas Metabólicas	4
1.5 Yuca o Cassava	5
1.6 Objetivos	10
Capitulo 2	
Materiales y Métodos	
Primera Fase Experimental	
2.1. Procesamiento de la yuca	11
2.1.1 Preparación de la harina	12
2.1.2. Contenido de humedad	12
2.2. Selección de microorganismos	12
2.2.1. Preservación de cepas	12
2.2.3 Descripción del equipo de medición	13
2.2.4. Tiempos de retención obtenidos	13
2.3. Crecimiento de microorganismos	14
2.4 Cinéticas de crecimiento	14
2.4.1 Levaduras	14
2.4.2 Bacterias Lácticas	15
II Segunda Fase Experimental	16
2.5 Cultivos Puros	16
2.5.1. Cuantificación de compuestos	17
2.5.2. Análisis Estadístico	17
Tercera Fase Experimental	19
Capitulo 3 Resultados Cultivos Puros	21
Capitulo 4 Resultados Cultivos Mixtos	35
Capitulo 5 Discusión	45
Capitulo 6 Conclusiones	54
Bibliografía	56

Resumen

Durante el presente proyecto, se realizó una selección de 14 microorganismos, bacterias lácticas y levaduras para ser utilizados en pruebas de fermentación en yuca.

Después de realizar una primera selección en base a su desarrollo en pruebas cualitativas en yuca, se conto con 4 levaduras y 4 bacterias lácticas.

La adición de una fuente extra de nitrógeno al medio, fue necesaria para favorecer el crecimiento de las cepas, sobre todo en el caso de las bacterias lácticas, en ambos tipos de microorganismos se obtiene una disminución en el pH, debido a la producción de ácidos carboxílicos.

De forma posterior, se realizo una nueva selección, se decidió trabajar con las combinaciones siguientes:1. *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* con *Endomycopsis fibuliger* o *S. fibuliger* (cepa de bacteria láctica utilizada en para modificar propiedades organolepticas de la leche y cepa de levadura amilolítica);2. *Lactobacillus plantarum* con *Candida tropicalis* (bacteria láctica amilolítica y levadura generadora de aromas).

Los cultivos mixtos de bacterias lácticas y levaduras utilizados en un sustrato amiláceo como es la yuca generaron nuevas propiedades organolépticas al producto final, se obtuvieron brindando aromas afrutados que correspondieron a los ésteres formato de isoamilo y acetato de isoamilo, los cuales fueron detectados en el medio.

También fueron identificados los ácidos carboxílicos: acético, láctico, cítrico; otros compuestos fueron etanol, acetaldehído. Es posible seguir estos compuestos durante la fermentación mediante técnicas de HPLC y CGL.

Durante la fermentación de la yuca utilizando cultivos mixtos mixtos, se presentan interacciones biológicas entre las especies. Una de ellas es simbiosis entre el microorganismo amilolítico que degrada el almidón de la yuca generando fuentes de carbono más fáciles de aprovechar y que facilitan el crecimiento de la cepa no amilolítico. Esto es, una especie se ve favorecida por otra sin afectarla en su desarrollo. Otra interacción biológica que se presentó fue la competencia por el sustrato. Estos tipos de interacciones pueden ser utilizadas para modificar el resultado final de la fermentación.

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

El término fermentación proviene del griego *fervere* que significa hervir y describe la acción de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos sobre diversos sustratos. En su acepción estricta, la fermentación se refiere a la obtención de energía en ausencia de oxígeno y generalmente lleva agregado el nombre del producto final de la reacción (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Desde hace más de 6000 años el proceso de fermentación ha tenido un papel importante en la modificación de las propiedades originales de los alimentos. La fermentación ha sido utilizada alrededor del mundo como un método para alcanzar diferentes fines, como su preservación por más tiempo o incrementar la calidad de los alimentos hasta mejorar sus propiedades organolépticas. (Nout y Sarkar, 1999).

Existen registros de fermentaciones de leche, carne y vegetales llevadas a cabo desde 6000 a. C. en el Medio Oriente. Estos procesos eran de tipo artesanal y en ellos el manejo y almacenaje en forma específica de ciertas materias primas daban como resultado el desarrollo de alimentos que, además de conservarse por largos periodos, adquirían nuevas características que los hacían aun más agradables. En la mayoría de los casos, la metodología y el conocimiento asociado con la elaboración de estos productos se heredaba de una generación a otra, por ejemplo, dentro de las comunidades locales, monasterios o estados feudales. Estos grupos producían generalmente cantidades relativamente pequeñas de los alimentos fermentados y éstos eran distribuidos en su interior o en áreas muy cercanas.

A mediados del siglo XIX ocurrieron dos eventos que impactaron significativamente la manera en que se realizaba la fermentación de los alimentos. En primer lugar, la Revolución Industrial generó la concentración de grandes masas en pueblos y ciudades como nunca antes. Como resultado de esto, la forma tradicional de distribuir estos productos ya no fue suficiente y para poder satisfacer los nuevos mercados se requirió de la industrialización de diferentes procesos, entre ellos los de fermentación.

En segundo lugar, el florecimiento de la microbiología como ciencia desde 1850 permitió una mejor comprensión de las bases biológicas de la fermentación, esto es, el papel que jugaban las bacterias, hongos y levaduras durante dicho proceso. Esto fue conduciendo de manera natural al desarrollo de procesos más eficientes y controlados. A finales de 1800 y principios de 1900 se desarrollaron métodos para aislar y propagar las levaduras y así obtener cultivos puros de estos microorganismos, esto fue el principio de los llamados iniciadores. Posteriormente se comenzó a pasteurizar los medios de cultivo y se inoculaba con el 10% aproximadamente del producto anterior para generar nuevas fermentaciones.

Alrededor de 1940 los principales productos de la fermentación eran biomasa de levadura, glicerol, ácido cítrico, láctico, etanol, acetona y butanol (Brian, et al. 1985). A partir de este momento se puede marcar el inicio de un nuevo periodo en el cual se realizan fermentaciones para obtener solventes orgánicos. Las técnicas que se desarrollaron para la producción de estos representaron un gran avance en la tecnología de la fermentación y marcaron el éxito de estos procesos. En esta época también se diseñaron las primeras plantas piloto que permitieron hacer pruebas de nuevas técnicas

en una escala de semi-producción y se mejoraron los procesos de extracción en gran escala para la recuperación de un antibiótico: la penicilina.

En años posteriores, tuvieron lugar los cambios más significativos en la industria de la fermentación dando como consecuencia el establecimiento de nuevos procesos incluyendo la producción de otros antibióticos así como vitaminas, giberelina, aminoácidos, enzimas y la transformación de esteroides (Collins, 1972; Dziezak, 1986). La etapa más reciente corresponde al desarrollo de microorganismos modificados genéticamente y utilizados de manera posterior en procesos fermentativos.

Sin embargo, debido a las estrictas regulaciones internacionales para el uso de microorganismos modificados genéticamente, se ha incrementado el interés por el uso de cepas no modificadas.

1.2 Fermentaciones tradicionales

Como ya se mencionó, los procesos de fermentación tradicionales se han realizado a través del tiempo para desarrollar bebidas y alimentos. En ellas participan una gran variedad de microorganismos que se desarrollan sobre diversos tipos de sustratos.

Es importante enfatizar que a pesar de los avances, los procesos tradicionales de fermentación se siguen realizando de manera regular en muchas regiones del mundo. Uno de los principales objetivos de las fermentaciones tradicionales es la preservación de los alimentos. La preservación de los alimentos por medio de la fermentación depende del principio de oxidación de los carbohidratos y derivados relacionados para generar productos finales, que generalmente son ácidos, alcohol y dióxido de carbono. Estos compuestos evitan el crecimiento de otro tipo de microorganismos que puedan llegar a descomponer por completo los alimentos.

La mayoría de los alimentos fermentados, dependen de procesos en los que intervienen bacterias lácticas y los productos finales de la degradación de carbohidratos por estas bacterias contribuyen a la preservación y a la modificación de las propiedades organolépticas de los alimentos, esto es, características nuevas y únicas a los alimentos.

La capacidad de controlar a los microorganismos específicos o una sucesión de estos durante una fermentación es la base del desarrollo de cultivos iniciadores (Narendranath et al, 1997).

Otras ventajas de la fermentación de los alimentos es incrementar su valor nutricional, aumentar su poder digestivo, o el incremento en la concentración de determinado producto de la fermentación como es el etanol o algunos subproductos como pueden ser vitaminas, antioxidantes, etc (Caplice y Fitzgerald, 1999). En el caso de algunos alimentos como lo es la yuca (cassava) se busca también disminuir su toxicidad a través de la fermentación (Okafor, 1989).

Bull en 1983 realizó una clasificación de los tipos de alimentos fermentados de acuerdo al sustrato y a los microorganismos que participaban y anotó lo siguiente:

- Desarrollo de sabores parecidos a la carne, como el shoyu y el miso.
- Desarrollo de texturas semejantes a las de la carne como el tempe.
- Fermentaciones alcohólicas, la mayoría de las cuales generan bebidas, aunque existen pastas de este tipo como el lao chao de China y el tape ketan de Indonesia.
- Fermentaciones ácidas en las que se genera ácido láctico, esto le otorga al producto obtenido una mayor resistencia a la descomposición, lo que le permite ser el método más económico para la preservación de los alimentos.
- Fermentaciones en que se realizan modificaciones en las propiedades organolépticas del sustrato original.

En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de fermentaciones tradicionales de alimentos y bebidas

Tabla 1 Ejemplos de fermentaciones tradicionales (Nche et al., 1996; Kемdirim et al., 1995; Reddy et al., 1985)

Producto	Lugar de Origen	Microorganismos involucrados	Sustrato
Kenkey	Ghana	Desconocidos	Maíz
Uji	Kenia	Bacterias lácticas, Hongos: <i>Penicilium spp.</i> Levaduras: <i>S. cerevisiae</i> , <i>Candida micoderma</i> , <i>C. vini</i>	Maíz
Gari	África Occidental	<i>Corynebacterium manihot</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Streptococcus sp</i>	Yuca (cassava)
Idli	India, Sri Lanka	<i>Ln. Mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Torulopsis sp</i> , <i>Candida sp</i> , <i>Trichosporum pullulans</i>	Arroz
Yoghurt	Internacional	<i>Lb. Bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Leche
Salsa de soya	Japón, China	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. Soyae</i> , <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Fríjol de soya Trigo
Pan	Internacional	<i>S. cerevisiae</i> , Bacterias lácticas	Trigo, sorgo
Bongkrek	Indonesia	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Coco
Mahewu	Sudáfrica	Bacterias lácticas	Maíz
Oncom	Indonesia	<i>Neurospora intermedia</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i>	Cacahuete
Tempeh	Indonesia, Surinam	<i>R. oligosporus</i>	Fríjol de soya
Nan	India	<i>S. cerevisiae</i> , bacterias lácticas	Harina de trigo
Queso	Internacional	Bacterias lácticas, ocasionalmente hongos	Leche
Salchicha fermentada	Europa, E.U:A.	Bacterias lácticas, <i>Streptococcus carnosus</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>M. Varians</i> , levaduras y hongos	Carne (puerco, res, pollo)
Aceitunas	Mediterráneo	<i>Ln. Mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Aceitunas verdes
Pepinillos	Internacional	<i>P. cerevisiae</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Pepino
Sauerkraut	Internacional	<i>Lb. Mesenteroides</i> , <i>Lb. Plantarum</i> , <i>Lb. Brevis</i> , <i>Lb. Curvatus</i> , <i>Lb. sake</i>	Col
Pozol	México	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Maíz

1.3 Fermentaciones realizadas con cultivos mixtos de bacterias lácticas y levaduras

Existe una gran variedad de fermentaciones en las cuales están involucrados cultivos mixtos de bacterias lácticas y levaduras. En la mayoría de ellos se trata de procesos ancestrales que han permanecido sin modificación hasta nuestros días.

Hasta tiempos recientes se consideraba de poca importancia el que durante un proceso de fermentación se desarrollaran diferentes tipos de microorganismos y cuando esto

ocurría podía beneficiar ó no al producto final. Para controlar estas situaciones se han desarrollado múltiples investigaciones y de esta manera se han logrado obtener metodologías que aseguran que el producto final sea el que se está buscando.

Algunos ejemplos de ello son los siguientes: Pardo y colaboradores publicaron en 1989 algunas de las interacciones entre bacterias lácticas y levaduras que ocurren durante la elaboración de vinos. Por otra parte, Querol y su grupo han realizado experimentos que intentan lograr aumentar la calidad de los vinos cuando se llegan a presentar malas cosechas, para lograr lo anterior han trabajado modificando parámetros microbiológicos, como son la utilización de diferentes cepas o cambiar las proporciones de los inóculos de cultivos mixtos (Querol et al., 1990).

Como se puede observar en la Tabla 1, en la mayoría de las fermentaciones tradicionales se han identificado tanto bacterias lácticas, como hongos y levaduras. Durante estos procesos se llevan a cabo cambios que permiten, de acuerdo al tipo de sustrato utilizado, el desarrollo de una u otra especie de microorganismo. De manera posterior, se pueden identificar otros tipos de microorganismos diferentes a los que iniciaron el proceso. El resultado de estas combinaciones otorga al producto final propiedades nuevas.

Como ya se mencionó antes, los sustratos utilizados en estas fermentaciones son diversos, por ejemplo, Vaughn (1985) hizo una revisión del desarrollo de microorganismos en fermentaciones de vegetales y mostró la constante presencia de combinaciones de bacterias lácticas y levaduras durante el proceso.

El desarrollo de técnicas para el mejoramiento de los procesos de fermentación tradicional ha sido dirigido principalmente, a obtener mejores productos con condiciones más higiénicas y controladas.

1.4 Rutas metabólicas de bacterias lácticas

Glucosa

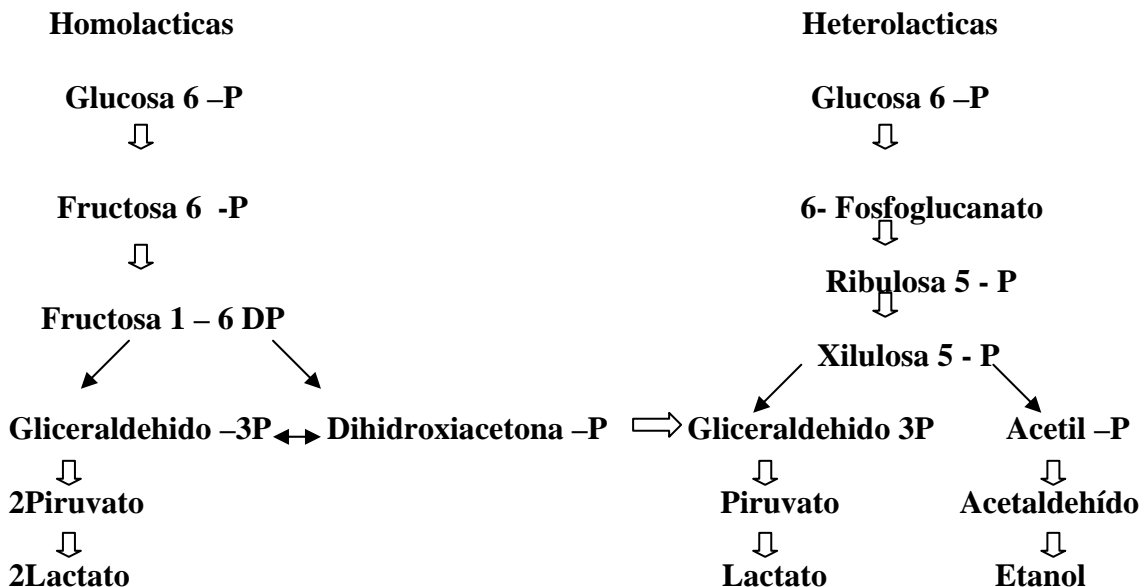


Fig. 1.1 Esquema general de la fermentación de glucosa en bacterias lácticas

Los compuestos que pueden ser identificados durante la fermentación realizada por bacterias lácticas son principalmente etanol y ácido láctico. En las figuras 1.1 y 1.2 se muestran las rutas metabólicas de las bacterias lácticas y en ellas se puede observar que en las llamadas homo-fermentativas el principal producto generado es el ácido láctico, sin embargo, bajo ciertas circunstancias se pueden obtener otros productos como el etanol, diacetilo, acetoina, etc (Caplice y Fitzgerald, 1999).

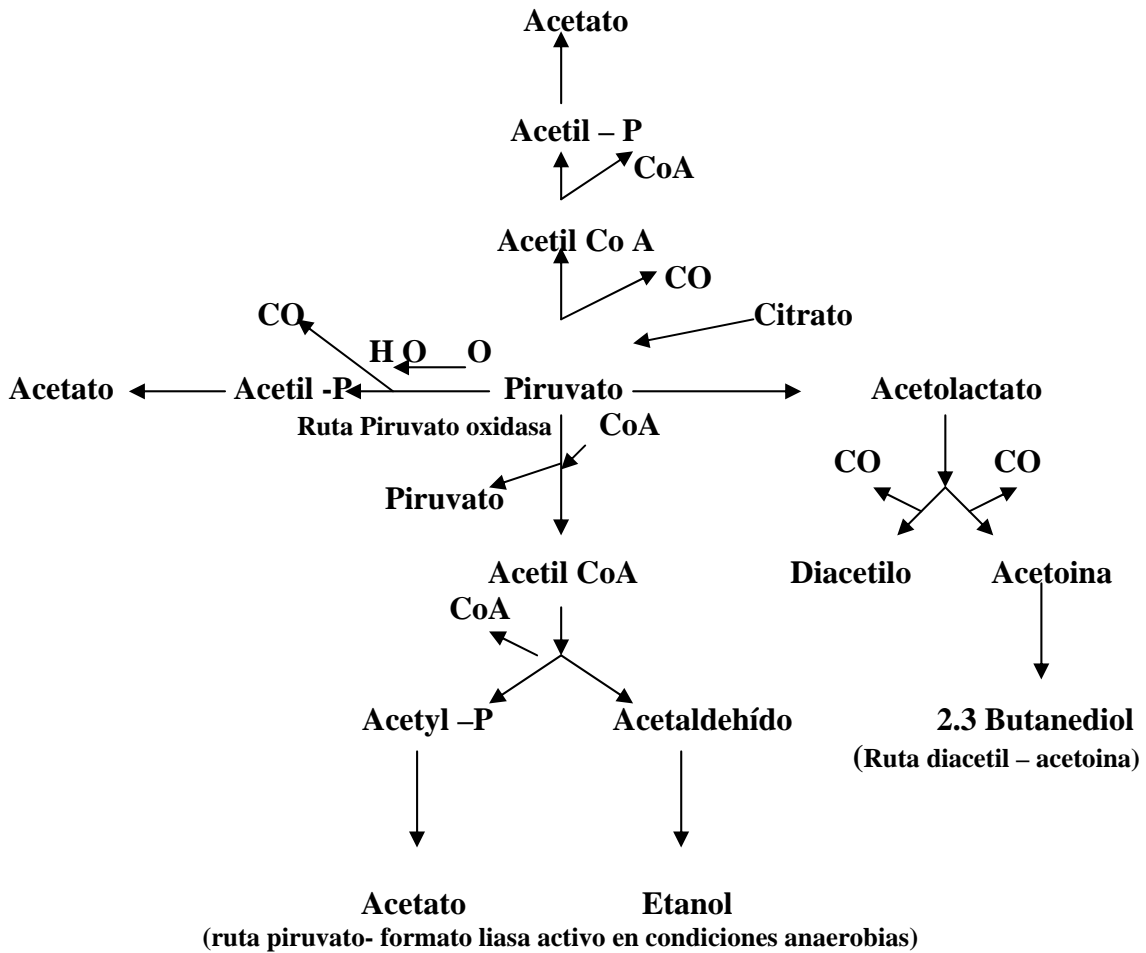


Fig. 1.2 Esquema general de la formación de productos metabólicos importantes a partir del piruvato en bacterias lácticas.

Por lo que respecta a las levaduras los productos finales obtenidos de la fermentación son el etanol y el bióxido de carbono. Mediante técnicas de detección se pueden identificar otros compuestos intermedios como son ácidos carboxílicos y otros.

1.5 La Yuca o Cassava

1.5.1 Características generales

La Yuca, *Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae, es uno de los tubérculos que constituyen el mayor suplemento de calorías de más de 500 millones de personas en África, Asia y América, principalmente en las regiones tropicales (Montaldo, 1985). En la República Mexicana se consume como alimento regularmente en las regiones de Chiapas, Tabasco, Veracruz y Morelos. Es empleada como alimento para consumo humano y de animales. Se utiliza también como materia prima en la fabricación de

almidón (Corbishey y Miller, 1984) y recientemente en la elaboración de etanol en Brasil y Estados Unidos (Ceballos, et al 2004).

1.5.2 Composición química de la raíz de la yuca

La yuca se clasifica en variedades dulces y amargas de acuerdo al contenido de ácido cianhídrico (HCN) de la raíz. En las variedades dulces el contenido de HCN es bajo, en tanto que en las variedades conocidas como amargas la concentración de este ácido es mayor (Ikediobi et al., 1980). La raíz de la yuca es un tubérculo con poco contenido de proteínas y de vitaminas; la mayor riqueza proteica así como la mayor cantidad de fibra se encuentran en la corteza, sin embargo, también es en ésta en donde se presentan las mayores concentraciones de HCN por lo cual prácticamente no se utiliza. En el cilindro central de la raíz es donde se presenta la mayor concentración de carbohidratos en forma de almidón.

La raíz de yuca consta de las siguientes partes: (Montaldo, 1972)

- a) La película suberosa que se desprende fácilmente y que representa el 1-2 % de la raíz total.
- b) La cascara o corteza que forma del 12 – 20% de la raíz.
- c) El cilindro central o pulpa que tiene dos clases de elementos, los vasos leñosos y las células parenquimatosas llenas de almidón; forma del 78 – 85% de la raíz.

1.5.4 Toxicidad de la yuca

Este tubérculo comparte con aproximadamente otras mil plantas, la capacidad de sintetizar el HCN o sus precursores, dando lugar a la formación de azúcares conocidos como cianogénicos. Los compuestos de este tipo que se han identificado en la yuca son linamarina y lotaustralina; la proporción en la que se encuentran es de 96:4, aproximadamente (Cooke, 1987).

Estos compuestos resultan tóxicos puesto que por acción enzimática se libera HCN (Okafor, 1989), lo cual ocurre generalmente cuando es consumida sin ningún tratamiento previo, esto a largo plazo produce envenenamiento tanto en los animales como en los seres humanos. Existen muchas maneras de disminuir la concentración de estos compuestos y se han abierto numerosas líneas de investigación al respecto, (White, W.L.B. et al, 1995). Una de ellas es mediante la fermentación de este tubérculo (Daugulis, 1989; Cooke, 1987).

1.5.5 Fermentación de la yuca

Como se puede observar en la Tabla 1, uno de los sustratos utilizados para realizar fermentaciones tradicionales es la yuca.

Se conoce una amplia variedad de productos obtenidos de la fermentación tradicional de este tubérculo en diversas partes del mundo (Lancaster et al., 1982). Estos procesos tienen como principales objetivos la disminución de HCN (Daugulis, 1989) y la modificación de sus propiedades organolépticas (Gunasekaran, 1989). El cambio en el sabor y en su consistencia son solo algunos ejemplos. La fermentación de la yuca es un proceso de acidificación (Amoa – Awua et al., 1996), durante el cual, una o varias especies de microorganismos, degradan el almidón, y otra u otras especies se desarrollan aprovechando los azúcares ahora disponibles en el medio y de esta manera, se forman diversos compuestos que otorgarán nuevas propiedades organolépticas al producto final, como pueden ser aromas, sabores, olores, consistencia y en algunos

casos, también se puede elevar el nivel proteico o disminuir la toxicidad del producto obtenido.

En la tabla 2 se muestran los principales productos obtenidos de la fermentación tradicional de la yuca.

Producto	Microorganismos detectados	Lugar de Origen
Gari	<i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Candida sp.</i>	África Occidental
Fufu	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactococcus brevis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>E coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	África
Lafun	<i>Bacillus sp.</i> <i>Kleibsiella sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i>	Nigeria
Chickwange	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zaire
Polvilho azedo	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Leuconostoc citrovorum</i>	Brasil
Attieke	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Costa de Marfil
Peujeum	Hongos y levaduras	Java
Harinas fermentadas	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Pichia membranaefaciens</i>	Varios Países

Tabla 2 Productos obtenidos de la fermentación tradicional de la yuca

A continuación se describen los principales productos obtenidos de la fermentación tradicional de la yuca, así como la forma en que se obtienen.

Gari

Este producto se consume ampliamente en muchos países de África Occidental. Para obtenerlo, el tubérculo de la yuca se cosecha, se pela y se lava. Posteriormente se raya y empaca en bolsas tejidas. Sobre éstas se coloca un peso para exprimir el jugo y se deja así durante varios días. De esta manera se lleva a cabo una fermentación natural.

Transcurridos esos días, el producto se cuela para remover partículas grandes e impurezas y luego se calienta en un sartén de acero volteando constantemente.

Posteriormente se seca hasta aproximadamente un 10% de humedad. En este momento se suele agregar un poco de aceite de palma para darle color. El Gari es el producto seco granular obtenido al final de este proceso.

La fermentación para obtener el Gari involucra grupos de levaduras y bacterias. Las densidades de población de los diferentes organismos que intervienen fluctúan a lo largo del proceso. Inicialmente las bacterias crecen rápidamente pero posteriormente las levaduras predominan. Originalmente se consideraba que la producción de gari era un proceso de dos fases en que *Corynebacterium sp.* y *Geotrichum candidum* eran los responsables de la producción de ácido y sabor. Sin embargo, fueron identificados otros microorganismos como *Lactobacillus plantarum* que es la especie a la que se le atribuye

el sabor característico del gari. Actualmente se sabe que participan otros cuatro géneros: *Leuconostoc*, *Alcaligenes*, *Lactobacillus* y *Candida*. *Corynebacterium sp* es el género más abundante al inicio del proceso de fermentación y al final su número va decreciendo. Las densidades de población de *Leuconostoc sp* y *Lactobacillus sp* se estabilizan después del cuarto día de fermentación mientras que las de *Corynebacterium sp* y *Alcaligenes sp* disminuyen significativamente después del tercer día. También se han hecho estudios de la contribución de los microorganismos en las propiedades organolépticas, así como de la disminución de HCN del gari.

Se ha concluido que *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* están presentes durante toda la fermentación de la yuca cuando se elabora el gari. Otras especies como *Corynebacterium manihot* y *Geotrichum candidum* se aislaron solamente dentro de las primeras 48 horas de la fermentación. De la amplia variedad de reportes relacionados con los microorganismos que participan en la elaboración del gari, se puede concluir que las bacterias lácticas son predominantes durante todo el proceso.

Una vez obtenido, el gari puede ser almacenado por mucho tiempo. En condiciones adecuadas puede conservarse hasta 16 semanas. En 1989 Revah y Meráz reportaron el desarrollo de Gari en condiciones de laboratorio obteniendo un producto similar al de la fermentación tradicional.

Fufu

El fufu es el alimento obtenido de la fermentación húmeda de la yuca y es muy popular en los países africanos. Para prepararlo los tubérculos se pelan, lavan y cortan en pedazos gruesos de aproximadamente 20 cm de largo. Se mantienen por un corto tiempo en agua y después se colocan en cazuelas durante 4 a 5 días, durante este tiempo el tubérculo se fermenta y se ablanda, liberando el HCN en el agua. Se genera un sabor característico muy agradable. Los productos finales son disueltos en agua limpia, se cuecen y las partículas de almidón obtenidas se dejan reposar por tres a cuatro horas. El agua es decantada y el sedimento se empaqueta en una bolsa se comprime y se amarra, después de lo cual se le colocan objetos pesados encima para extraer el exceso de agua, finalmente se hacen bolitas y se cuecen en agua por 30 a 40 minutos. El fufu suele comerse con salsas, sopas o en guisados.

Los microorganismos reportados que participan en la fermentación de la yuca para obtener este producto incluyen a una gran variedad de bacterias lácticas de los siguientes géneros: *Leuconostoc*, y *Lactobacillus*. También se ha reportado la presencia de *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecalis* y *E. coli*. Es importante aclarar que se presenta una sucesión de microorganismos, es decir, no todos se presentan al mismo tiempo (Amoa-Awua, W, et al 1996).

Lafun

Se le llama lafun a la harina fina de la yuca preparada por fermentación y se consume principalmente en los estados occidentales de Nigeria. La raíz completa o pelada se deja fermentar en agua por tres o cuatro días hasta que se suaviza. Después de este tiempo se retira el producto del agua, se eliminan las fibras y la cáscara y la pulpa se corta en trozos pequeños. Se deja secando al sol de uno a tres días dependiendo del clima. Con estos trozos se elabora una harina que se añade al agua hirviendo hasta que se forma una pasta gruesa. Esta se enfría hasta una temperatura media y suele consumirse con sopa.

En esta fermentación participan microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Corynebacterium*, *Candida* y *Lactobacillus*. Se presenta una sucesión microbiana que culmina con una dominancia de las levaduras después de 48 horas de fermentación.

Chickwangué

Es el alimento fermentado de yuca más popular en Zaire. Para prepararlo se pelan las raíces se ponen en agua, dejándose fermentar por tres días hasta que se suavizan. Se remueven las fibras de la pulpa y se cubre con hojas. Se coloca un peso sobre ellas para ejercer presión y así drenar el exceso de líquido. Después se muele, se envuelve en hojas de plátano y se cuece al vapor. Este alimento fermentado de la yuca es el que se produce bajo las condiciones más higiénicas y contiene la menor concentración de HCN (Amoa-Awua, W, et al 1996).

Polvilho Azedo

Este alimento es un producto típico brasileño que se obtiene de la fermentación de la yuca por periodos de más de treinta días. Su proceso consiste básicamente en el lavado de las raíces que posteriormente se pelan, se rayan, se presionan y se cuelan bajo una corriente de agua, este producto se deja fermentar y después se seca al sol. Debido a que el periodo de fermentación es muy largo, no es fácil identificar cuando finaliza. El producto fermentado tiene un sabor fuerte y característico y se usa en muchas aplicaciones en la cocina local así como en la elaboración de panes de queso y bizcochos.

Durante la fermentación el pH disminuye al irse formando ácidos orgánicos. Los microorganismos identificados en este proceso pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Leuconostoc*.

Existe un producto similar en Colombia que se utiliza en la elaboración de pan de yuca y pan de bono, sin embargo, en este país el tiempo de fermentación es más corto.

Agbelina

Se produce al colocar trozos de raíces de yuca fresca con un inóculo procedente de una o más fermentaciones previas. La mezcla se coloca en sacos y se deja fermentar por dos o tres días. Los géneros que han sido reportados en este tipo de fermentación son *Bacillus* spp (Amoa-Awua, W, et al 1996).

En las descripciones anteriores, existen varios géneros de microorganismos que fermentan de manera natural la yuca. Esto permitió elegir entre una amplia variedad de ellos a los que podían ser utilizados en el presente trabajo. Se tomó la decisión de seleccionar a algunos de los que se han reportado durante las fermentaciones tradicionales de yuca.

Como se anotó más arriba en la mayoría de los procesos de fermentación tradicional de la yuca se tiene muy poco control por lo que el resultado final no siempre es el mismo. Se han desarrollado algunas metodologías en el laboratorio para llevar a cabo estos procesos de manera más controlada.

De lo anterior, se desprenden los siguientes:

1.6 Objetivos

A) General.

Estudiar el efecto de las posibles interacciones biológicas de bacterias lácticas y levaduras en cultivo mixto utilizando como sustrato la yuca *Manihot esculenta* Crantz, así como detectar las modificaciones de las propiedades organolépticas basándose en los productos obtenidos durante la fermentación.

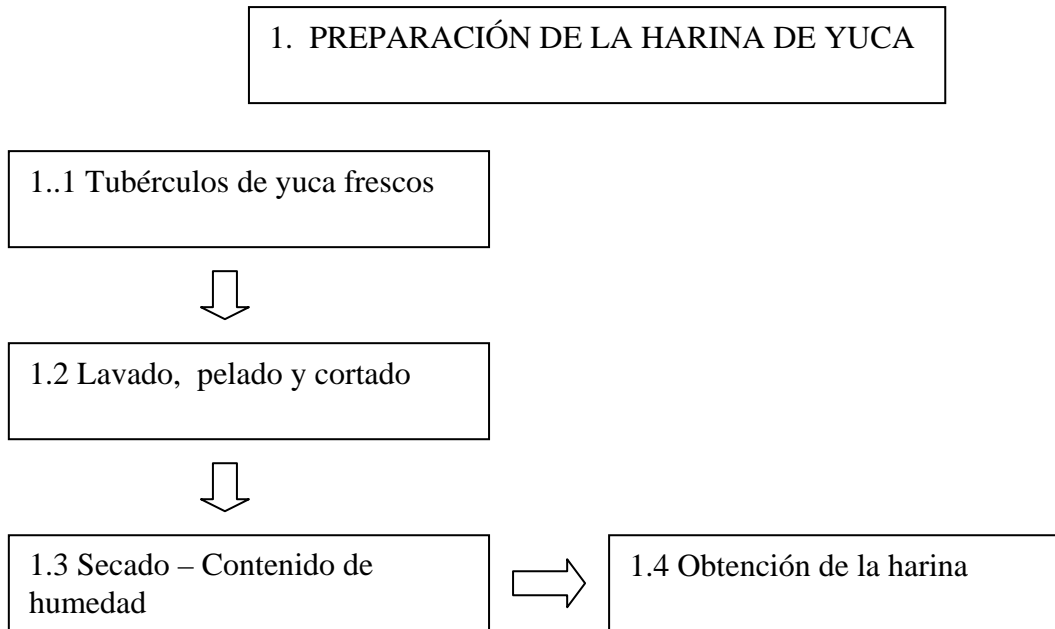
B) Particulares

1. Selección de cepas de bacterias lácticas y levaduras utilizando yuca como sustrato principal con base en su capacidad amilolítica o de generar compuestos aromáticos.
2. Estudios cinéticos de crecimiento en fermentación sumergida y semisólida en yuca
3. Estudio de las cepas en cultivos mixtos de la siguiente manera:
Bacteria láctica con capacidad amilolítica / levadura generadora de aromas
Bacteria láctica generadora de aroma / Levadura con capacidad amilolítica.

CAPITULO 2 MATERIALES Y METODOS

La etapa experimental se llevó a cabo en tres fases, las cuales se ilustran en las figuras 2.1 a 2.3.

PRIMERA FASE EXPERIMENTAL



Selección de microorganismos, mantenimiento de cepas y preparación de inóculos

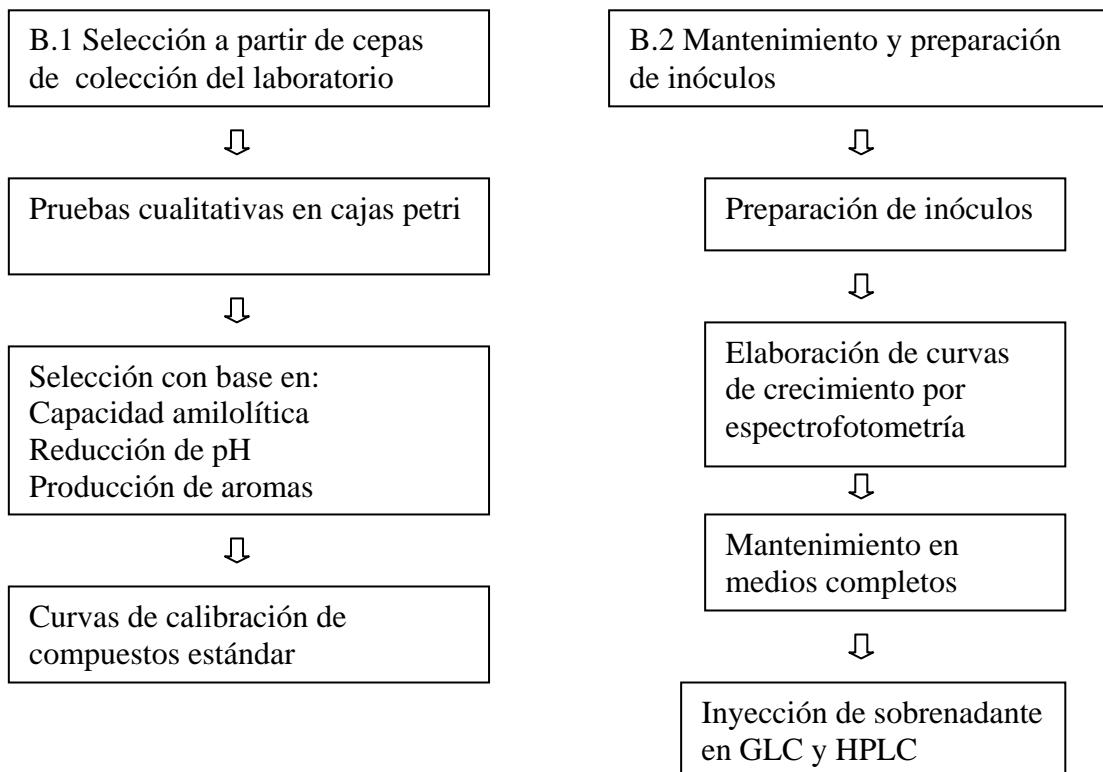


Figura 2.1 Primera fase del diseño experimental

2.1 Procesamiento de la yuca

Para la realización de las fermentaciones se utilizó la harina de yuca como sustrato. Se diseñó un proceso para obtener ésta harina a partir de yuca fresca.

La raíz de yuca se adquirió en la Central de Abastos de la Ciudad de México y proviene de las regiones de Tabasco y Veracruz. En estas zonas del País se siembran las variedades conocidas como “dulces”, es decir, su contenido de HCN es bajo.

2.1.1 Preparación de la harina

Las raíces de yuca se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de tierra y posteriormente se pelaron y se quitó la película suberosa que es una capa muy fina que se presenta cuando está fresca. Los tubérculos limpios de color amarillo claro se cortaron en rodajas pequeñas (tipo chip) y se removieron las fibras que presentaban. Después se introdujeron en una estufa para secado y se aplicó una corriente de aire frío.

Una vez hecho esto, las rodajas secas obtenidas se colocaron en un molino para obtener una harina de grano muy fino y homogéneo.

La harina se almacenó en frascos de vidrio cerrados herméticamente que se mantuvieron a 4 °C para evitar contaminación.

2.1.2 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad en la raíz fresca de la yuca se realizaron pruebas de la siguiente manera: se tomaron tres muestras de 100 gramos de yuca fresca y se secaron utilizando una estufa con corriente de aire, se pesaron cada 12 horas por un lapso de dos días.

Se encontró que el contenido de humedad en la yuca fue de 70%. Con esta proporción se realizaron las fermentaciones en condiciones semisólidas.

2.2 Selección de microorganismos

En la tabla 2.1 se muestran las cepas que fueron tomadas de la colección del laboratorio de Ingeniería de Procesos Hidráulicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, de las cuales se partió para la realización del presente proyecto.

Levaduras	Bacterias lácticas
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> (APG –Eurozym)
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>
<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> (NRRL – B – 184)
<i>Schwannomyces castelli</i>	
<i>Debariomyces castelli</i>	

Tabla 2.1 Cepas de levaduras y bacterias empleadas en el presente proyecto. Todas ellas provinieron de la colección del Departamento de Ingeniería y Procesos Hidráulicos de la UAM Iztapalapa.

2.2.1 Preservación de las cepas

El medio utilizado para la conservación de las levaduras fue el de papa – dextrosa – agar (PDA).

Para *Lactococcus* sp se utilizó el medio de leche descremada (Skim Milk) al 10% .

Para las cepas del género *Lactobacillus* se utilizó el medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Sharpe, 1981).

Para las cepas del género *Leuconostoc* se utilizó el medio de la tabla 2.2

Compuesto	Porcentaje (w/v)
Glucosa	2
Extracto de levadura	2
K ₂ HPO ₄	0.02
Na ₂ SO ₄	0.001
MnSO ₄	0.001
FeSO ₄	0.001
NaCl ₂	0.001

Tabla 2.2 Medio utilizado para las cepas del género *Leuconostoc*

2.2.2 Calibración de compuestos estándar

Para la realización de curvas de calibración se utilizaron compuestos de la pureza más alta en el mercado. Los que se detectaron fueron los siguientes: azúcares reductores, ácidos carboxílicos, etanol, acetaldehído, diacetilo y acetoina. Los métodos de identificación y medición utilizados fueron cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC), usando detectores de índice de refracción y de luz ultravioleta; cromatógrafo gas – líquido, usando un detector de ionización de flama. Para las curvas de calibración fueron utilizados estándares internos (Shaw y Wilson, 1981).

Las curvas de calibración obtenidas se usaron para poder cuantificar la concentración de estos compuestos generados durante la fermentación de la yuca.

2.2.3 Descripción de equipo de medición.

El cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia utilizado fue de la marca Hewlett – Packard de la Serie 9180 –B, conectado a dos detectores, el primero de índice de refracción y el segundo de luz ultravioleta. Estos detectores se acoplaron a un integrador y graficador Spectra – Physics SP4270/SP4290.

Se utilizó una columna Aminex de intercambio catiónico de la marca BioRad con las siguientes condiciones cromatográficas: flujo de 0.8 ml por minuto, utilizando como solvente una solución de ácido sulfúrico a una concentración de $1 \times 10^{-8} \text{M}$ y una temperatura constante de 60 °C (Schwarzenbacck, 1982).

Se realizaron inyecciones en gradiente desde 10 hasta 100µl de cada solución estándar utilizándose viales de 1ml.

El cromatógrafo de gases utilizado fue de la marca Shimadzu con un detector de ionización de flama. Las condiciones de medición fueron las siguientes: La temperatura del detector y del inyector se mantuvieron constantes a 180 grados centígrados, se utilizó una columna Carbowax a – 12 y se realizaron inyecciones de 1 a 5µl. El integrador utilizado fue de la marca Hewlett – Packard.

Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas de la marca Hewlett – Packard modelo 5890. Se usó una columna capilar (crosslinked methyl silicone 6µm) Hewlett – Packard de 12m x 0.2mm x 0.33 µm de espesor de película. Se utilizó Helio como gas acarreador con un flujo de 2ml/min. El programa de temperatura usado fue de 30 – 70 °C, manteniéndose isoterma a 30°C durante 10 min y luego se incrementó un grado por minuto.

2.2.4 Tiempos de retención obtenidos

Se obtuvieron los siguientes tiempos de retención como se muestra en la tabla 2.3

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Equipo utilizado
Almidón	4.3	HPLC
Maltosa	5.92	HPLC
Ácido láctico	9.58	HPLC
Etanol	16.36	HPLC
Diacetilo	4.5	GLC
Acetoína	6.2	GLC
Acetaldehído	5.1	GLC

Tabla 2.3 Tiempos de retención obtenidos por los compuestos estándar y el equipo utilizado.

2.3 Crecimiento de microorganismos en yuca

Se sembraron en cajas Petri los diferentes microorganismos mencionados en la tabla 2.1. Se dejaron crecer por tres días en los medios descritos en la tabla 2.4, utilizando en todos los casos agar al 1.5%.

Medio	Composición
1	Yuca al 5%
2	Yuca al 5% + glucosa 1%
3	Yuca al 5% + peptona 0.5%
4	Yuca al 5% + peptona 0.5% + glucosa 1%
5	Yuca al 10%

Tabla 2.4 Composición de los medios utilizados en cajas petri

2.4 Cinéticas de crecimiento

Para la realización de las cinéticas de crecimiento se utilizaron los siguientes medios:

Levaduras	Leuconostoc	<i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lactobacillus spp</i> (Elicker)
Extracto de levadura 1% Peptona 2% Glucosa 1%	Peptona 1% Extracto de carne 1% Extracto de levadura 0.5% Glucosa 2% K ₂ HPO ₄ 0.2% Acetato de sodio 0.5% Citrato de amonio 0.2% MgSO ₄ 0.02% MnSO ₄ 0.02% Tween 80 0.01%	Tripton 0.5% Extracto de levadura 0.25% Gelatina 0.25% NaCl 0.4% Acetato de sodio 0.15% Glucosa 0.5%

Tabla 2.5 Medios utilizados para realizar las cinéticas de crecimiento de levaduras y bacterias lácticas.

2.4.1 Levaduras

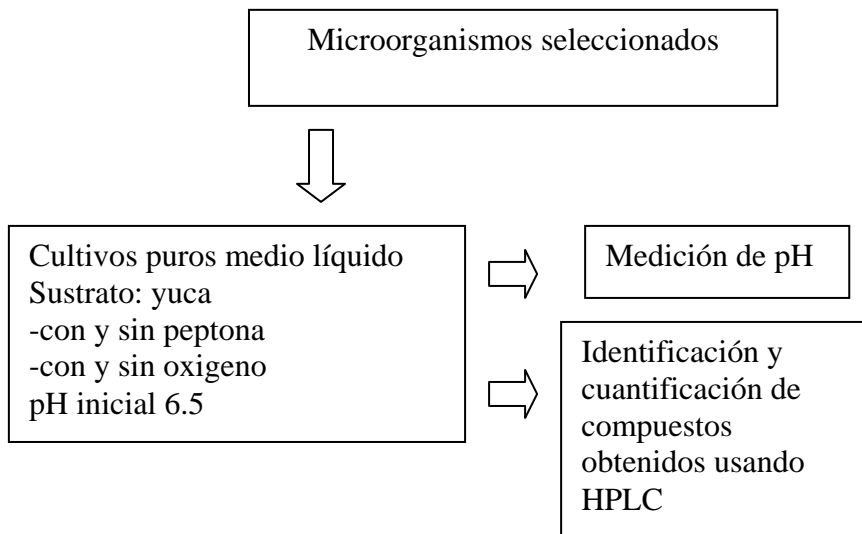
Para la realización de las cinéticas de crecimiento se usó el siguiente procedimiento: se colocaron 50ml de medio en matraces de 125 ml y se taparon con algodón y papel aluminio. Se sembró utilizando un asada y se mantuvieron a 30 °C en agitación continua mientras duró la fermentación. Se realizaron mediciones a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Se

midió la densidad óptica con un espectrofotómetro digital a una longitud de onda de 540nm.

2.4.2 Bacterias lácticas

Se siguió el mismo procedimiento que en la cinética de levaduras con las siguientes variantes: no se realizó agitación, se tomaron muestras a las 4, 8, 12, 24, 36 y 48 horas en las fermentaciones realizadas por microorganismos del género *Lactobacillus*. Para las bacterias de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* se tomaron muestras a las 2,4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Segunda fase Experimental



Selección de cepas

Amilolíticas: *Endomycopsis fibuliger*
Lactobacillus amylovorus

No amilolíticas: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*
biovar *diaceylactis*
Candida tropicalis

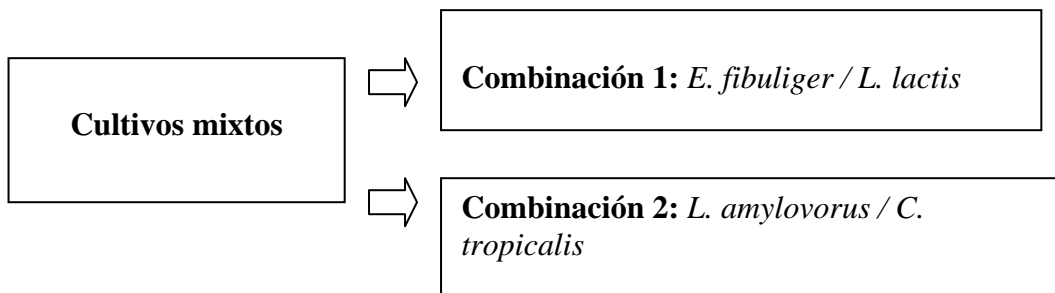


Figura 2.2 Segunda fase del diseño experimental

2.5 Cultivos puros

Para la realización de las fermentaciones en cultivo puro se llevó a cabo un diseño de experimentos por el método de Box – Wilson. Como se muestra en la tabla 2.6, para cada levadura se realizaron cuatro fermentaciones. Para las bacterias lácticas se llevaron a cabo 2 por cada cepa, esto es, un total de ocho experimentos. En total se realizaron 25 fermentaciones en medio líquido utilizando cultivos puros.

Las fermentaciones efectuadas con base en el diseño experimental ya mencionado, se llevaron a cabo en matraces de 125ml en los que se adicionó 50ml de agua destilada. La fermentación duró en total 96 horas.

Microorganismo	Glucosa 1%	Peptona 1%	pH inicial 6.5	O ₂	Temp.. 30°C	Yuca 5%	Inóculo 1%
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>L. amylovorus</i>	+	+	+	-	+	+	+
<i>L. amylovorus</i>	+	-	+	-	+	+	+

Tabla 2.6 Diseño experimental de cultivos puros

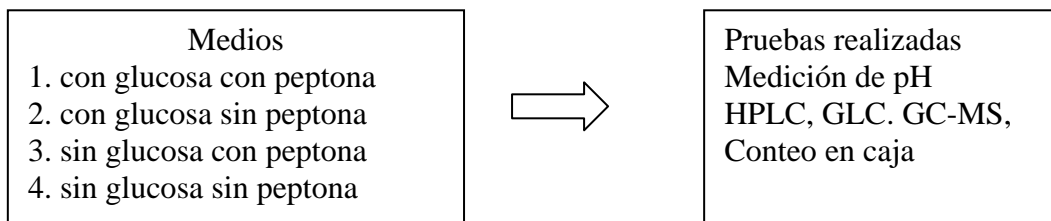
2.5.1 Cuantificación de compuestos

Se tomó una alícuota que se centrifugó durante 15 minutos en una microfuga marca Eppendorf serie 5415, a una velocidad de 14000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se filtró utilizando papel marca Millipore de 45 µm. Se realizaron inyecciones de 50 µl en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia con las condiciones que se establecieron en las corridas de los compuestos estándar.

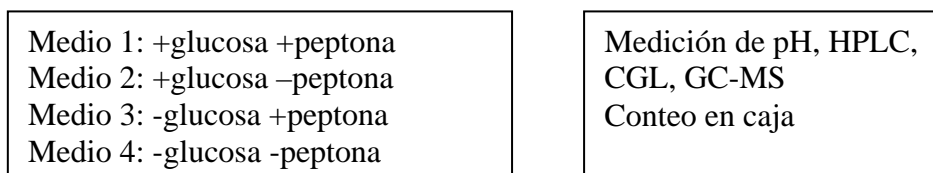
2.5.2 Análisis estadístico

Los resultados se procesaron con el paquete estadístico SPSS –X (Statistical Package for Social Sciences) versión 2.0, realizando los análisis de varianza y de desviación estándar.

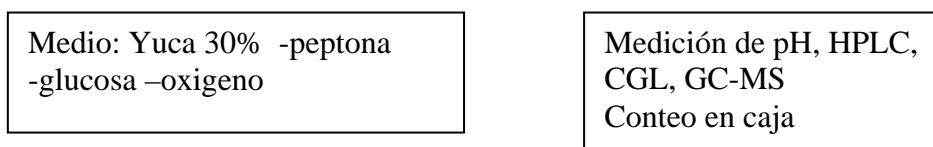
Tercera Fase Experimental
Fermentaciones en cultivo mixto



Cambio en la proporción del inóculo
Levaduras:1 / Bacterias lácticas:9



Nueva variable: Condiciones Estériles y no Estériles



Nueva variable: Utilización de un biorreactor tipo airlift

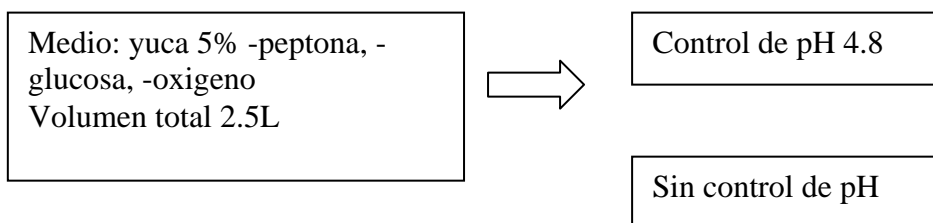


Figura 2.3 Tercera fase del diseño experimental

En esta etapa se realizaron los cultivos mixtos tanto en un medio líquido como en uno semisólido. Además se llevaron a cabo pruebas en un fermentador con capacidad de tres litros.

2.6 Fermentaciones en cultivo mixto en medio líquido

2.6.1 Fermentaciones Relación 1:1

Las fermentaciones se llevaron a cabo de la siguiente forma: se utilizaron los medios descritos en la figura 2.3, colocando 50 ml en matraces de 125 ml con tapón de rosca. El inóculo fue de 1%. Cada experiencia se realizó por triplicado. Los matraces se colocaron en un baño agitado a 400 rpm y a 30° C. Se fueron tomando muestras cada 24 h para realizar el análisis correspondiente.

El análisis de muestras fue el mismo que se utilizó para los cultivos puros, a saber: medición directa de pH, inyección en HPLC, CGL y GC-MS. Se hicieron conteos en caja, lo cual se llevó a cabo de la siguiente manera: se agitó la muestra durante 30 segundos, se tomó una alícuota de 1ml, se realizaron diluciones sucesivas en una solución salina estéril (NaCl 0.1%) hasta llegar a 1×10^{-9} . Se sembró 1ml en cajas por triplicado, utilizando un medio de Rogosa (MRS), se sembraron diluciones desde 1×10^{-8} hasta 1×10^{-5} , incubándose en una estufa a 30°C. Se realizan conteos a las 48 horas de siembra. El conteo de bacterias lácticas y de levaduras se pudo realizar de manera simultánea, debido al tamaño y a la forma de las colonias y a que ambos tipos se desarrollan bien en el medio utilizado.

2.6.2 Fermentación de cultivos mixtos en medio líquido

Se llevó un cambio en la proporción de levaduras vs bacterias lácticas que en esta fase fue 9:1, para lo cual se hizo lo siguiente: las combinaciones seleccionadas fueron *E. fibuliger* / *L. lactis* ssp *lactus* biovar *diacetylactis* y *C. tropicalis* / *L. amylovorus*. Se sembró con 0.45 ml de inóculo de bacterias lácticas y 0.05 ml del de levaduras para completar 0.5ml de inóculo. En este caso también se utilizaron matraces de 125 ml de capacidad y con tapon de rosca, conteniendo 50ml de medio, utilizando los medios descritos en la figura 2.3, se hicieron experimentos por triplicado y se colocaron en un baño a 30°C, con agitación de 200 rpm.

Se tomaron muestras cada 24 horas y se realizaron los siguientes análisis: Medición directa de pH, conteo en caja, inyección en HPLC, GLC y GCMS, con las condiciones ya mencionadas.

Se llevaron a cabo inyecciones directas de 1 y 2µl en cada corrida. Se realizó una extracción con acetato de etilo para determinar que tipo de ésteres se formaban.

2.6.3 Fermentación con yuca al 30%

Para las fermentaciones en las que se usó yuca al 30% se siguió una metodología diferente: se preparó una solución utilizando 300g de harina de yuca y se adicionó agua mientras se agitaba para ir incorporando la harina. Se agregó agua hasta completar 1000 ml. Se colocaron 100 ml de esta mezcla en bolsas de plástico que posteriormente se sellaron con calor.

La variable en este caso fue condiciones estériles y no estériles. Para las primeras se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, en tanto que para las segundas se inocularon sin tratamiento previo. El inóculo fue de 1% manteniendo una relación de 1:9 de levaduras /bacterias lácticas como ya se mencionó. Después de ser

inoculadas, se volvieron a sellar con calor y se colocaron en una estufa a 30°C. Cada experimento se hizo por triplicado y se fueron tomando matraces cada 24 horas para análisis. Para el conteo en caja se hicieron diluciones hasta 1×10^{-10} .

2.6.4 Fermentación controlada en un fermentador

Se utilizó un fermentador marca Bioflo III durante esta fase experimental. En este equipo de tres litros de capacidad se puede controlar el pH, la cantidad de oxígeno disuelto, así como también puede ser usado en cultivo continuo. Se llevaron a cabo fermentaciones líquidas con y sin control de pH como variable, usando 2.5L de medio de cultivo. Las condiciones utilizadas fueron: temperatura 30°C, en ausencia de oxígeno, pH inicial de 6.5. El medio no contenía peptona ni glucosa. Se tomaron muestras cada ocho horas hasta llegar a 48, después cada 12 horas hasta las 96 horas donde se detuvo la fermentación. Las muestras fueron sometidas al mismo análisis ya mencionado anteriormente.

CAPITULO 3

RESULTADOS

Cultivos puros

Con el objetivo de facilitar el análisis, los resultados obtenidos en la fase experimental se presentan en dos capítulos. En el presente se analizaron los cultivos puros, en el siguiente los cultivos mixtos.

3.1 Pruebas cualitativas de crecimiento de microorganismos en yuca.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos durante las pruebas realizadas en cajas petri.

Tabla 4 Crecimiento cualitativo de bacterias lácticas y levaduras utilizando yuca como sustrato
Medios: 1. Yuca 5% (medio más pobre), 2. Yuca 5% + glucosa 1%; 3. Yuca 5% + peptona 0.5%; 4. Yuca 5% + peptona 0.5% + glucosa 1% (medio más rico); 5. Yuca 10%. Clave de crecimiento: +++ abundante; ++ moderado; + escaso; - nulo.

<i>Microorganismo</i>	Medios				
	1	2	3	4	5
Candida tropicalis	+	++	+	+++	++
Candida pseudotropicalis	++	++	++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	++	++	+++	++
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Geotrichum candidum</i>	+	+	+	+++	++
<i>Debariomyces castelli</i>	-	+	-	++	-
<i>Schwanomyces castelli</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	-	-	++	-
Lactobacillus amylovorus	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	++	+
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i>	-	-	-	++	-
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	-	-	-	++	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++	++	+++	++

Estas pruebas fueron fundamentales para realizar una primera selección. Como se puede observar, como sigue:

Las levaduras *S. castelli*, *E. fibuliger* y la bacteria láctica *L. amylovorus* fueron las cepas que tuvieron un crecimiento abundante (+++) en todos los medios. Las cepas que tuvieron crecimiento moderado (++) fueron *S. cerevisiae*, *G. candidum* y *L. cellobiosus*, *L. plantarum* y *C. tropicalis*. Por otra parte, hay cepas que muestran un crecimiento pobre en medios cuyo único sustrato es la yuca, estas fueron *L. lactis* ssp *diacetylactis* y *K. marxianus*. Por lo que respecta a *L. mesenteroides*, presentó un crecimiento escaso. En base a lo anterior se decidió realizar la siguiente fase experimental con las cepas:

Levaduras: *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *E. fibuliger* y *G. candidum*.

Bacterias lácticas: *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. lactis* ssp *diacetylactis*, *L. mesenteroides*.

La cepa *S. castelli* presentó un comportamiento similar a *E. fibuliger*, sin embargo, en esta última se obtuvo un aroma afrutado muy agradable después de la fermentación. Por esta razón se decidió utilizar esta última en la siguiente etapa experimental.

3.2. Estandarización del inóculo por crecimiento de microorganismos en medio líquido

Con la finalidad de estandarizar los medios de cultivo para la preparación del inóculo de los cultivos puros, se estudió el crecimiento para cada cepa. Los resultados obtenidos mostraron que la fase estacionaria para las bacterias lácticas se estableció después de 24 horas de cultivo. Por lo que respecta a las levaduras se alcanzó esta fase estacionaria a las 48 horas. Estos fueron los tiempos de cultivo utilizados para inocular los medios en todas las fermentaciones posteriores.

3.3 Cultivos puros en medio líquido

Se seleccionaron las siguientes cepas para mostrar los datos gráficamente: *E. fibuliger* y *L. amylovorus* cepas amilolíticas. *L. lactis ssp diacetylactis* y *Saccharomyces cerevisiae* cepas no amilolíticas.

3.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

En la figura 3.1 se graficaron las curvas que representan las unidades formadoras de colonias (UFC), por *S. cerevisiae* en cuatro diferentes medios. Se puede observar en el medio sin oxígeno y sin peptona el crecimiento fue el menor 6.3×10^5 el crecimiento fue mayor en el de oxígeno y peptona 5.01×10^7 .

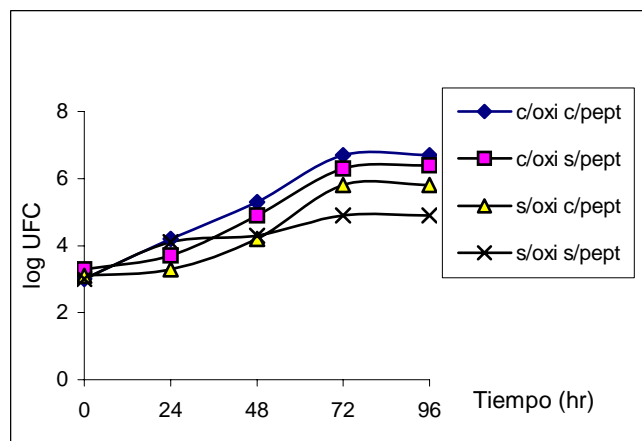
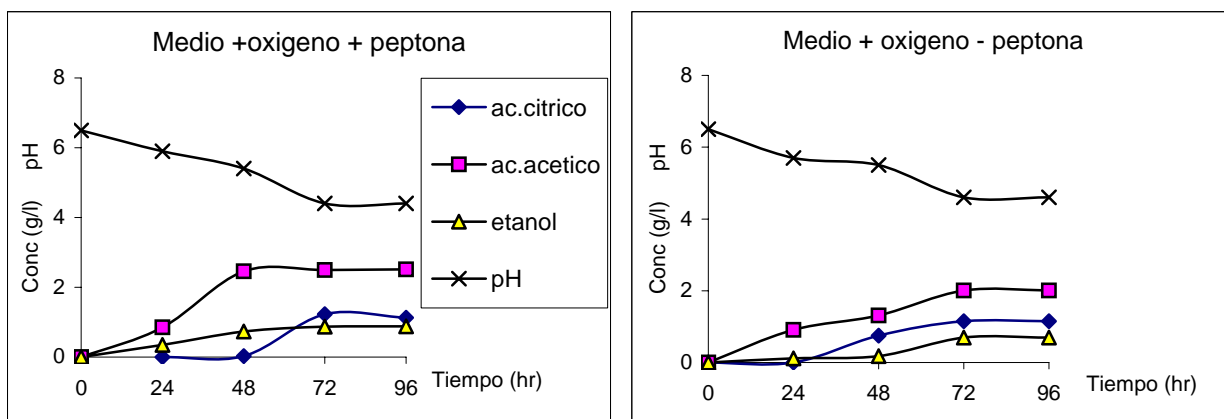


Fig 3.1 Gráfica de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

En la figura 3.2 se graficaron los productos obtenidos durante la fermentación de *S. cerevisiae* en yuca, En ella se muestran las concentraciones obtenidas para cada compuesto cuantificado. También se graficó la caída del pH.



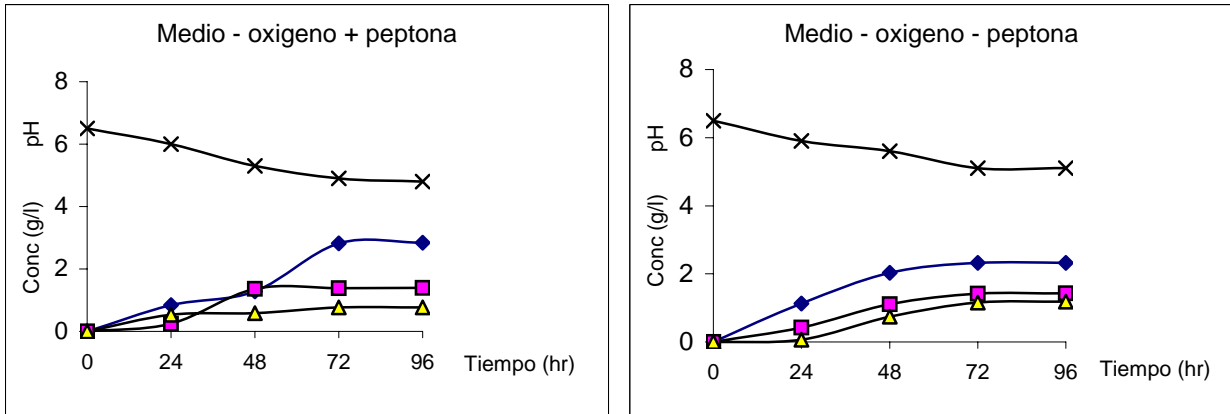


Fig3.2 Evolución de productos generados y variación de pH por *S. cerevisiae* durante la fermentación de yuca

Se puede observar una mayor producción de ácido acético en los tres primeros medios, de hasta 3 g/l en el medio con oxígeno y con peptona, sin embargo en el cuarto medio, sin oxígeno y sin peptona se produjo en mayor cantidad ácido cítrico. Un compuesto que se obtuvo en concentraciones similares en los cuatro medios fue el etanol, alrededor de 1 g/l. Por lo que respecta a la variación de pH, se presentó una caída de hasta 4.4 en el medio con oxígeno y con peptona. En los otros medios los valores estuvieron más cercanos a 5. En la figura 3.3 se observa el perfil seguido por la glucosa en los cuatro medios.

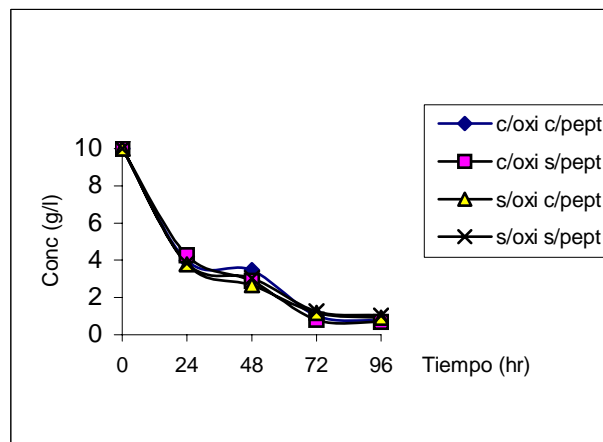


Fig 3.3 Consumo de glucosa por *S. cerevisiae*

Durante las primeras 24 horas se consumió más de la mitad de la glucosa y después de 72 casi se agotó esta fuente de carbono prácticamente en todos los medios, registrándose valores alrededor de 1 g/l.

3.1 *Endomycopsis fibuliger*

Por lo que respecta a esta levadura, las cepas presentaron una mayor afinidad por el sustrato, ya que al tratarse de una cepa amilolítica, el número de UFC fue mayor como se muestra en la figura 3.4. Se presentó un mayor crecimiento en el medio con oxígeno y con peptona

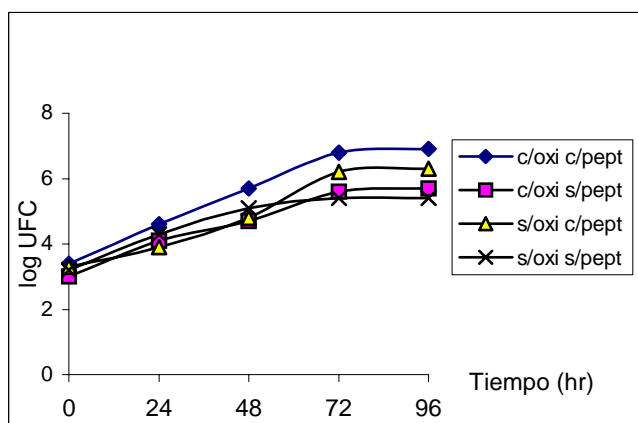


Fig 3.4 Crecimiento de *E. fibuliger* en los diferentes medios de cultivo

Se cuantificaron los productos obtenidos y los resultados se muestran en la figura 3.5.

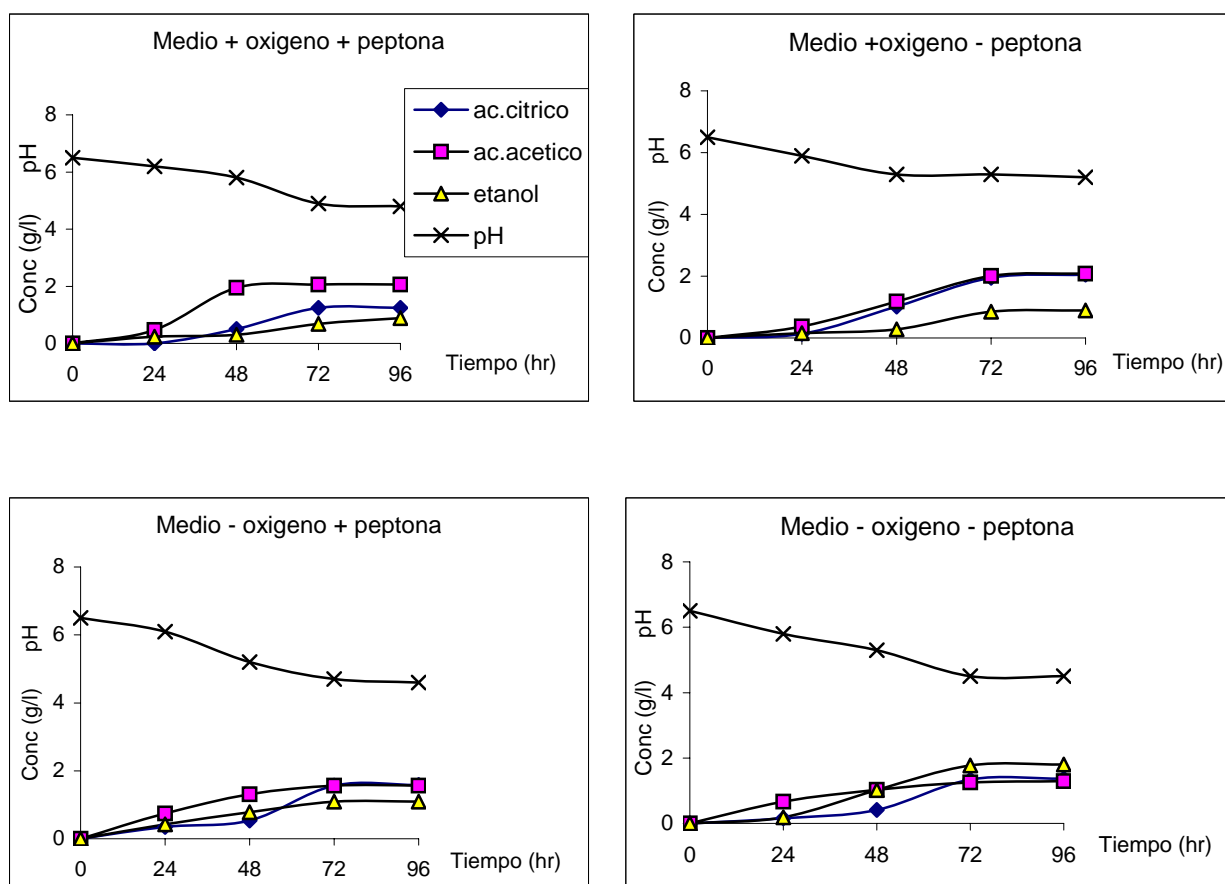


Fig 3.5 Evolución de productos generados y variación de pH por *E. fibuliger*.

La mayor concentración de etanol se presentó en el medio sin oxígeno y sin peptona y fue de 2.4 g/l. En estas fermentaciones se produjeron concentraciones menores de ácidos carboxílicos comparativamente a la realizada por *S. cerevisiae*: alrededor de 1 g/l de ácido cítrico y 1.7 de ácido acético. En la figura 3.6 se muestran las concentraciones de glucosa obtenidas durante los cuatro días de fermentación de *E. fibuliger*. En esta gráfica se puede observar que la concentración de la glucosa al final de 96 horas de fermentación se fue de entre 6 a 8 g/l.

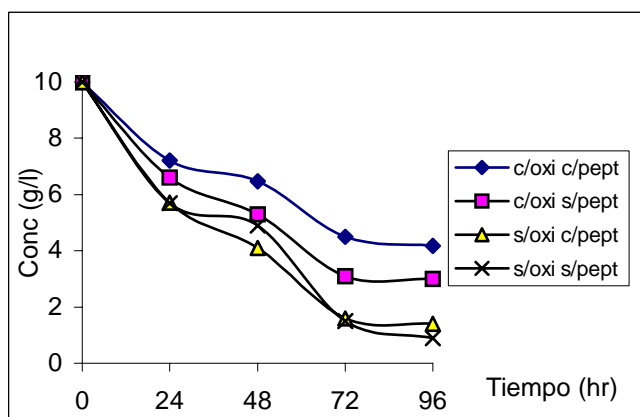


Fig 3.6 Consumo de glucosa por *E. fibuliger*

Después de la fermentación se presentó un aroma afrutado como a piña y se identificó mediante CG-SM y el espectro obtenido se comparó con estándares llegando a la conclusión de que se trataba de isoamil-formato. El cromatograma obtenido sí como los dos espectros de masas (el detectado y el estándar se muestra en la figura 3.7

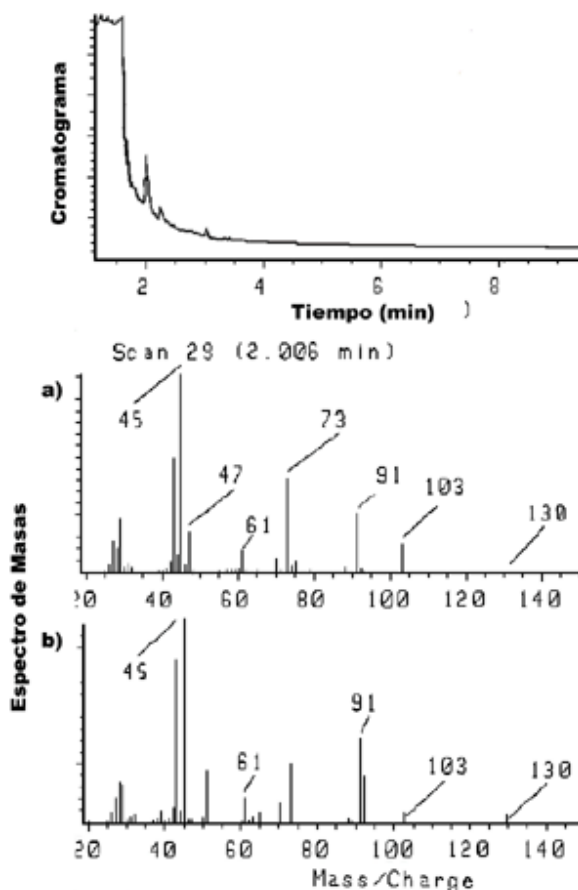


Fig 3.7 Cromatógrama y espectro de masas (EM) obtenido de la fermentación de *E. fibuliger*. A) (EM) muestra y b) EM estándar inyectado del isoamil-formato.

3.2 *Geotrichum candidum*

Para esta cepa se presentó un mayor desarrollo de colonias en el medio con oxígeno y con peptona. En la figura 3.8 se muestra las UFC por *G. candidum* en los cuatro medios.

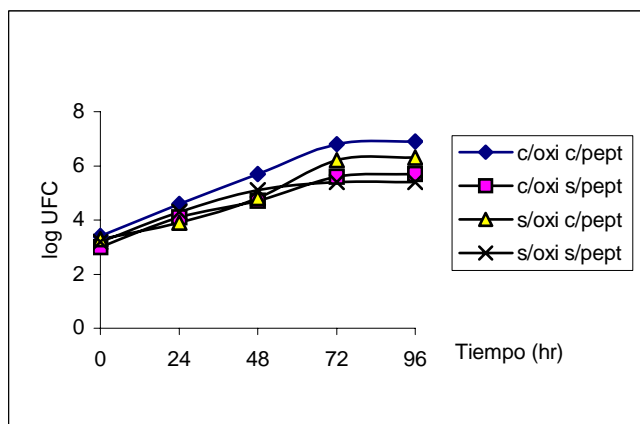


Fig 3.8 Crecimiento de *G. candidum* en los diferentes medios utilizados

Por lo que respecta a las concentraciones de los compuestos obtenidos, el ácido acético fue el que se produjo en mayor concentración en el medio con oxígeno con peptona y fue de 2.1 g/l. Estos resultados se muestran en la figura 3.9. El compuesto que se produjo en menor concentración fue el etanol.

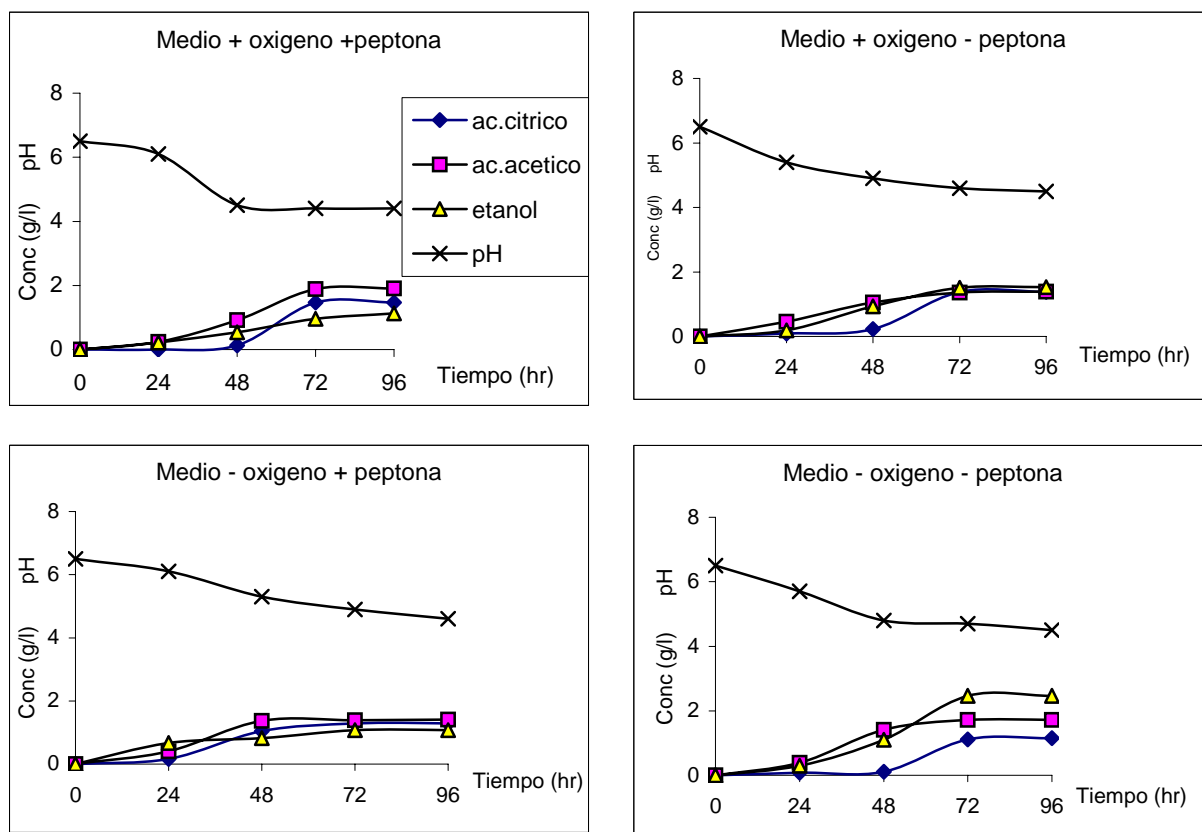


Fig 3.9 Evolución de productos generados y variación de pH por *G. candidum*

3.4 *Candida tropicalis*

Los resultados obtenidos para esta levadura muestran que el mayor crecimiento se dio en el medio con oxígeno y con peptona obteniéndose valores de UFC de 2.5×10^6 . En la figura 3.10 se muestra las UFC correspondientes a los cuatro medio utilizados.

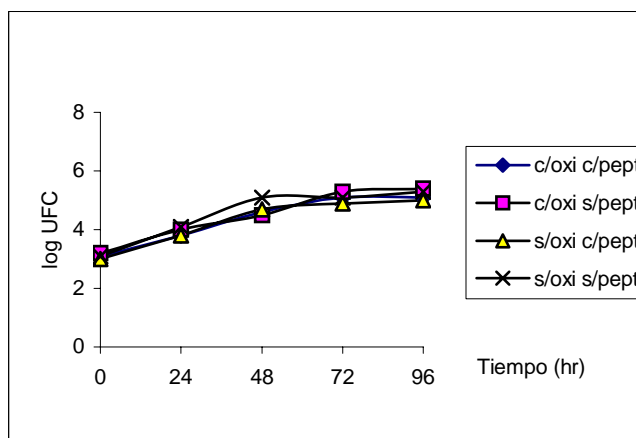


Fig 3.10 Crecimiento de *C. tropicalis* en los diferentes medios utilizados

El ácido cítrico fue el que se produjo en mayor concentración en el medio con oxígeno y sin peptona alcanzando valores de 2 g/l

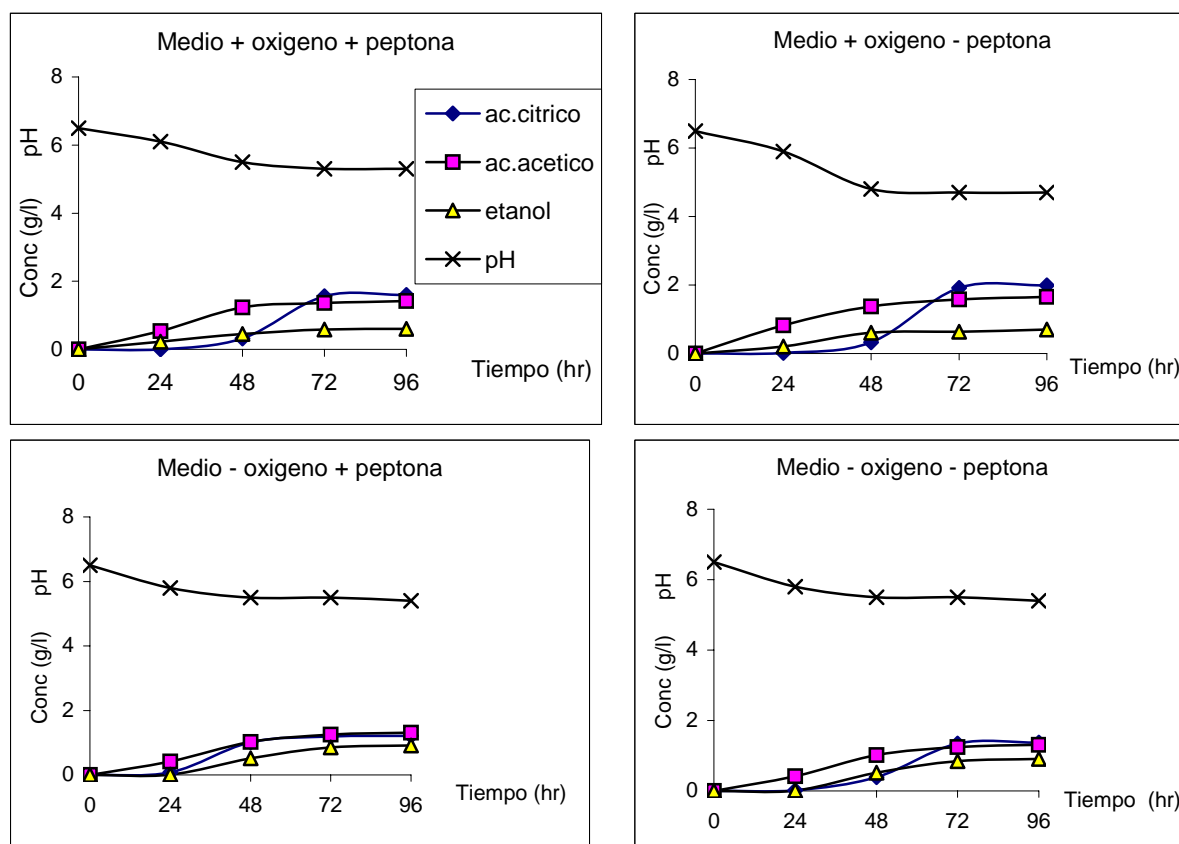


Fig 3.11 Cinética de productos generados y caída de pH por *C.tropicalis*.

En este mismo medio se obtuvo la mayor concentración de ácido acético que fue de 1.6 g/l. Por lo que respecta a el etanol se produjo en mayor concentración en el medio sin oxígeno y con peptona y fue de 1.3

g/l. En la figura 3.11 se muestran los resultados obtenidos en cada medio. La variación de pH fue mayor en el medio con oxígeno y con peptona de 4.7. Por lo respecta a la glucosa, esta prácticamente se consumió por completo en todos los medios, llegando a valores de 0.3 g/l. En la figura 3.12 se muestra la concentración de la glucosa en los cuatro medios.

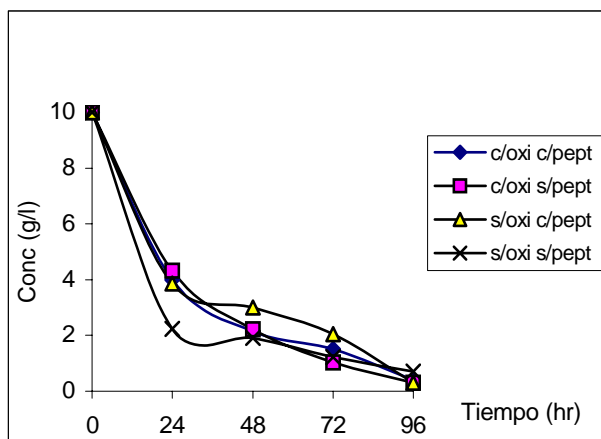


Fig 3.12 Consumo de glucosa por *C. tropicalis*

3.5 *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis*

Para las cepas de bacterias lácticas se utilizaron dos medios en los cuales se comparó la presencia y ausencia de una fuente de nitrógeno utilizando para esto peptona. En estos medios se crecieron las cepas en ausencia de oxígeno. En la figura 3.13 se graficaron las UFC para los dos medios ya mencionados y se puede observar que se presenta crecimiento similar en ambos medios, sobre todo después de 72 horas de crecimiento.

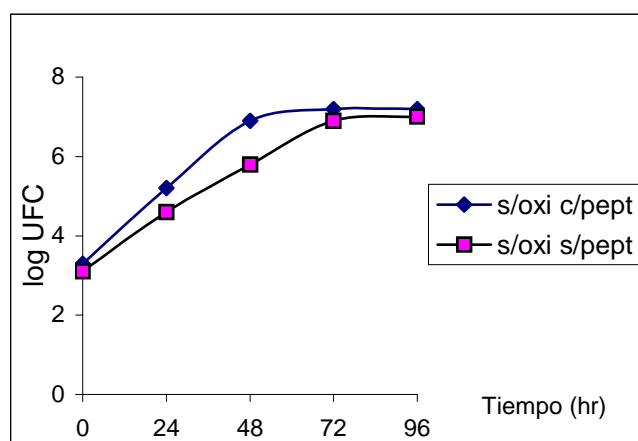


Fig 3.13 Crecimiento de *L. lactis* en los diferentes medios utilizados

Los compuestos obtenidos se ilustran en la figura 3.14. El compuesto que se produjo en mayor concentración fue el ácido láctico.

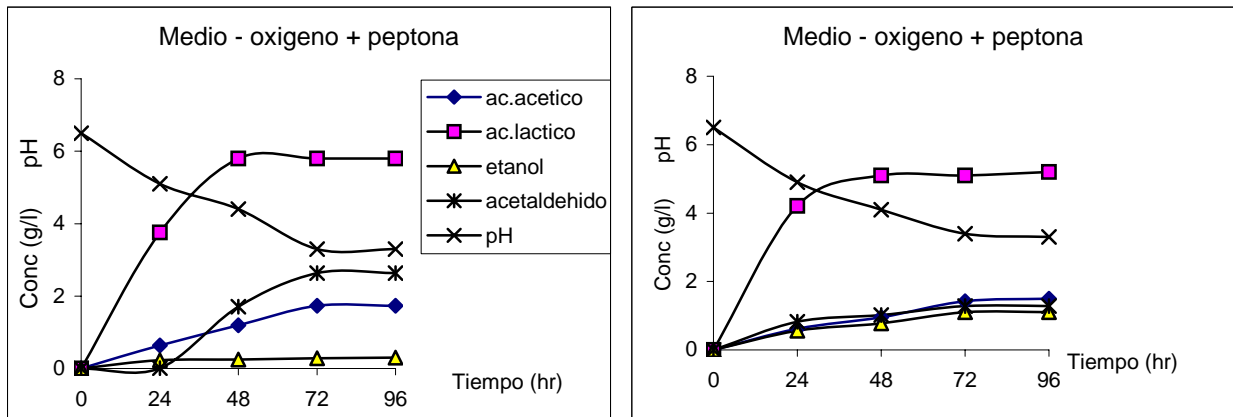


Fig 3.14 Evolución de productos generados y variación de pH por *L. lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis*

Este compuesto se produjo en mayor concentración en el medio con peptona, obteniéndose valores de 6 g/l. Otro compuesto que se generó fue el etanol en concentraciones menores de 1 g/l. También se cuantificó acetaldehído en ambos medios, produciéndose en mayor concentración en el medio con peptona. Por lo que respecta a la caída del pH, se registró el mismo valor después de cuatro días de fermentación y que fue de 3.1. En la figura 3.15 se muestra el perfil de la glucosa en ambos medios, después de 96 horas, que indica que se ha consumido prácticamente.

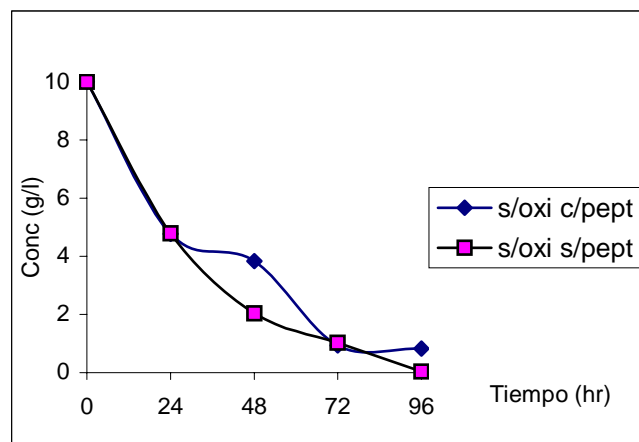


Fig 3.15 Consumo de glucosa por *L. lactis*

3.5 *Leuconostoc mesenteroides*

Para este microorganismo se presentó un menor desarrollo, comparativamente con la cepa anterior. Los resultados se muestran en la figura 3.16 con respecto a las UFC, en ambos medios.

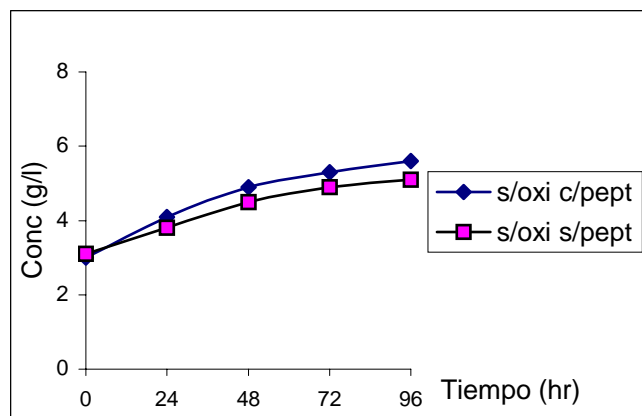


Fig 3.16 UFC por *L. mesenteroides*

La producción de compuestos por *L. mesenteroides* se muestra en la figura 3.17, en la cual se puede observar que la concentración de ácido láctico alcanzada fue de 4.5 g/l en el medio con peptona.

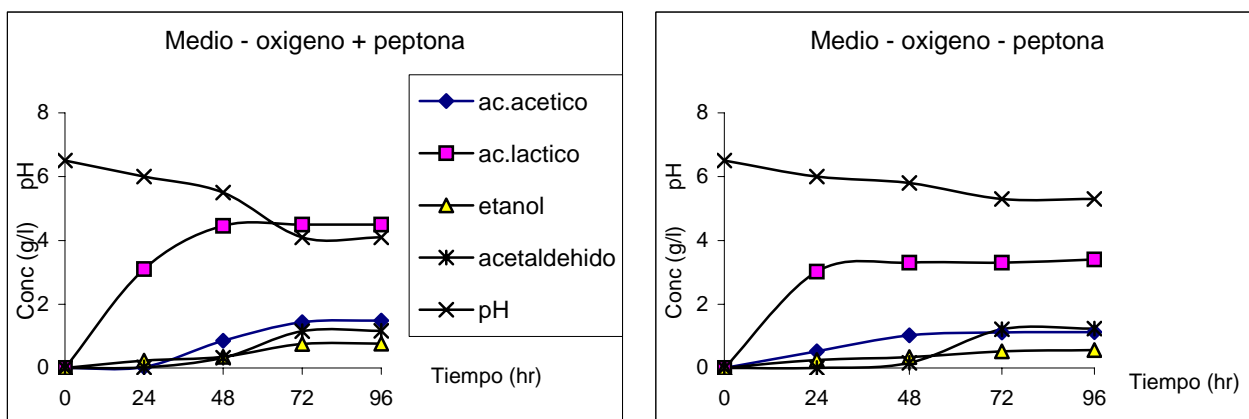


Fig 3.17 Evolución de productos generados y variación de pH por *L. mesenteroides*

La mayor concentración de etanol fue 1.5 g/l en el medio con peptona en tanto que para el ácido acético fue de 2 g/l en el mismo medio. Por lo que respecta a la mayor concentración de acetaldehído fue de 0.9 g/l también en el mismo medio. Por lo que respecta a la disminución del pH, llegó a valores de 4, en el medio con peptona. El consumo de glucosa observado durante la fermentación por *L. mesenteroides* se puede observar en la fig 3.18.

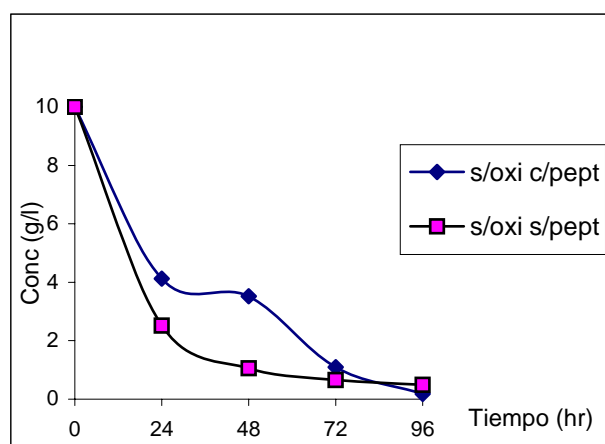


Fig 3.18 Consumo de glucosa por *L. mesenteroides*

3.7 *Lactobacillus plantarum*

Las UFC de esta cepa que se desarrollaron de manera similar en los dos medios aunque fue ligeramente mayor en el que tenía peptona, lo que puede observarse en la figura 3.19.

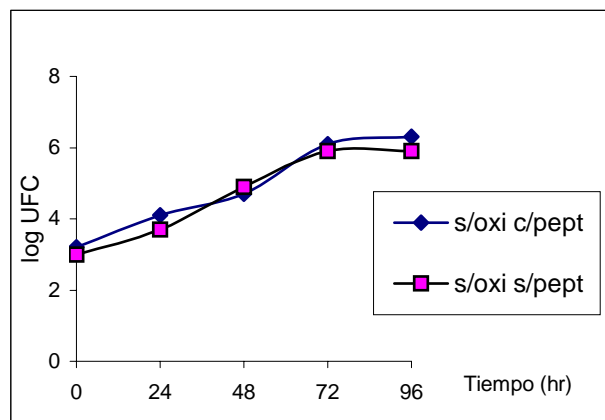


Fig 3.19 Crecimiento de *L. plantarum* en los diferentes medios

La concentración de los compuestos obtenida por esta cepa se ilustra en la figura 3.20

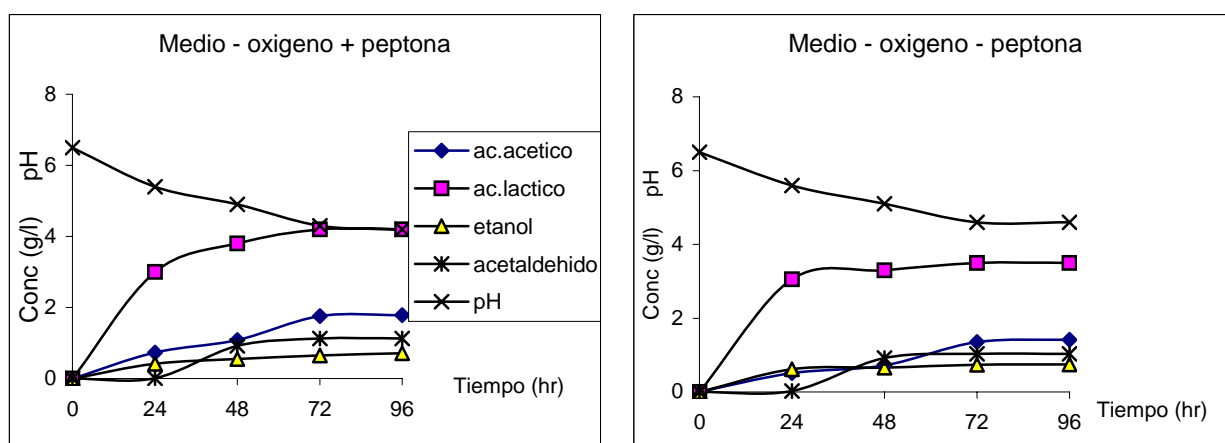


Fig 3.20 Evolución de productos y variación de pH por *L. plantarum*

La mayor concentración obtenida de ácido láctico fue de 4.9 g/l en el medio con peptona. En este mismo medio se obtuvo también la mayor concentración de 1.1 g/l de acetaldehído y de 1.8 g/l de ácido acético, aunque la producción de etanol no fue muy alta, se generó en mayor concentración en el medio sin peptona y fue de 0.8 g/l. Por lo que respecta a la caída de pH, este disminuyó hasta 4.2 en el medio con peptona, en tanto que se registró un valor de 4.6 en el medio sin peptona. La concentración de glucosa casi llegó a cero en ambos medios después de cuatro días de fermentación, como puede observarse en la figura 3.21.

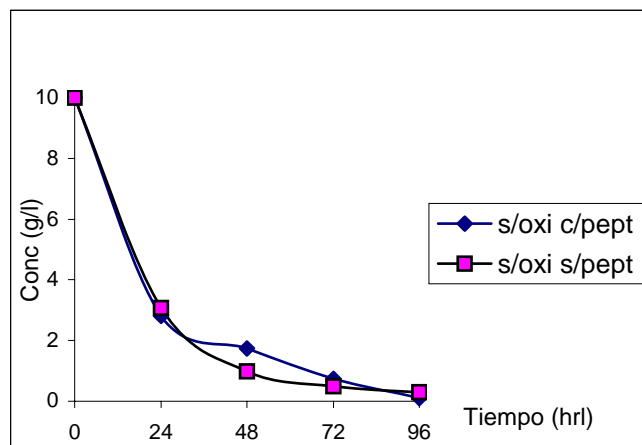


Fig 3.21 Consumo de glucosa por *L. plantarum*

3.8 *Lactobacillus amylovorus*

Para este microorganismo se presentó un menor número de UFC en el medio sin peptona, como puede observarse en la figura 3.22.

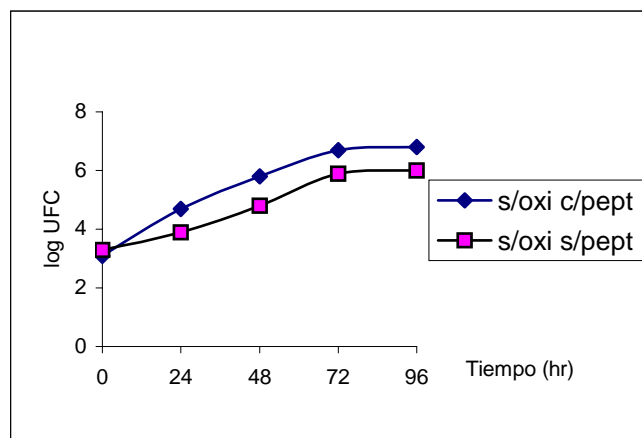


Fig. 3.22 Crecimiento de *L. amylovorus* en los diferentes medios

Los compuestos obtenidos se muestran en la figura 3.22. La mayor concentración de ácido láctico se obtuvo en el medio con peptona y fue de 6.2 g/l. La concentración de etanol fue menor a 1 g/l en ambos medios, aunque ligeramente mayor en el que contenía peptona y fue de 0.8 g/l. El acetaldehído se obtuvo en mayor concentración en el medio con peptona (1.3 g/l).

Por lo que respecta a la variación de pH fue mayor en el medio con peptona llegando a un valor de 3.6 en el medio con peptona.

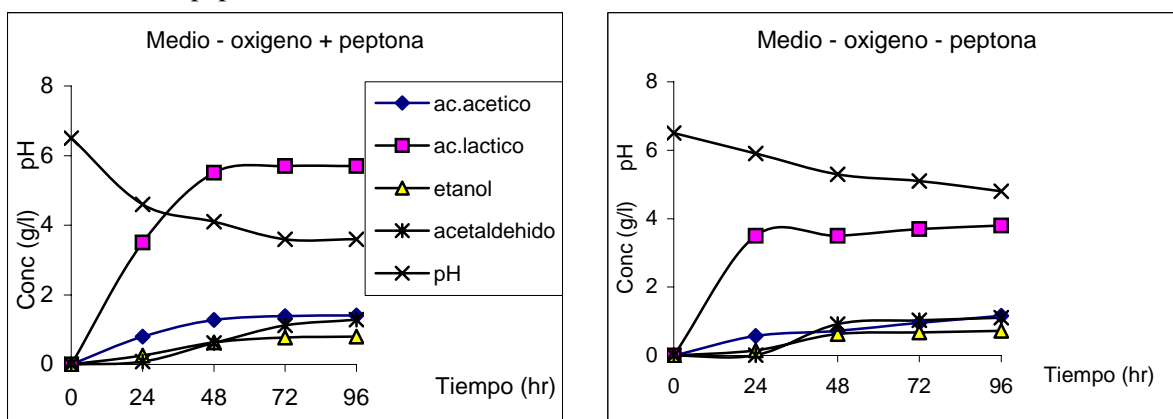


Fig 3.22 Evolución de productos generados y variación de pH por *L. amylovorus*

Por lo que respecta a la glucosa, se detectaron concentraciones arriba de 5 g/l en ambos medios. Como se puede observar en la figura 3.23, el perfil de glucosa seguido por este microorganismo es diferente a los tres anteriores.

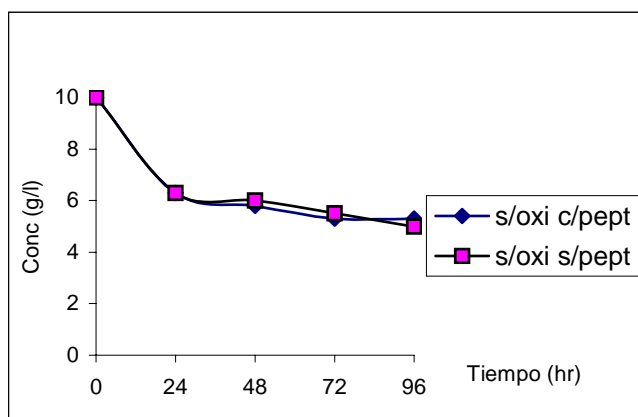


Fig 3.24 Consumo de glucosa por *L. amylovorus*

4 Análisis Estadístico

En la tabla 5 se ilustran los resultados obtenidos mediante el procedimiento estadístico mencionado en el capítulo 2. Se desarrolló con base en la concentración de compuestos generados durante la fermentación. Primero se intentó establecer si se presentaron diferencias significativas con respecto al medio. Posteriormente se realizó el análisis con respecto a los microorganismos entre sí.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la interacción microorganismo/medio con respecto a la concentración de la glucosa presentó diferencias significativas, tanto para levaduras como bacterias lácticas. Cuando las cepas amilolíticas no fueron consideradas para el análisis, no se presentaron diferencias significativas.

Por lo que respecta a la producción de etanol, se presentan diferencias significativas en las levaduras, en tanto que para las bacterias lácticas solo se presentaron con relación a los microorganismos.

compuesto	Microorganismo/ Medio	Medio	Microorganismo
Acido cítrico Levaduras	n.s	**	n.s
Acido acético Levaduras	n.s	*	*
Bact. lácticas	n.s	n.s	*
Acido láctico Bact. lácticas	n.s	**	*
Etanol Levaduras	n.s	n.s	**
Bact. lácticas	**	**	**
Glucosa Levaduras	** n.s(1)	** n.s(1)	** n.s(1)
Bact. lácticas	** n.s(1)	** n.s(1)	** n.s(1)

Tabla 4 Análisis estadístico de cultivos puros en yuca

*** diferencias significativas, **diferencias altamente significativas; n.s no hay diferencias significativas; (1) análisis realizado sin considerar cepas amilolíticas**

Por lo que respecta al medio utilizado no se presentan diferencias significativas en las levaduras, pero si en las bacterias lácticas, sobre todo con respecto al producción de ácido láctico. Para la producción de ácido cítrico por las levaduras se presentaron diferencias significativas con respecto al medio utilizado. Considerando al microorganismo, tanto las bacterias lácticas como las levaduras presentaron diferencias significativas con respecto a la glucosa y al etanol, lo que tiene que ver con las cepas amilolíticas. Cuando no se consideran éstas para el análisis no se presentan diferencias significativas.

CAPITULO 4

Resultados Cultivos Mixtos

Después de haber hecho una selección de los microorganismos ya mencionados, se procedió a realizar experimentos con cultivos mixtos. Se trabajó con combinaciones teniendo una relación 1:1 y posteriormente de 9:1 de bacterias lácticas y levaduras respectivamente. La razón de hacer esto, es favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en medio líquido y medio semisólido. Posteriormente se utilizó un fermentador con 2.5 l de capacidad.

Para las fermentaciones semisólidas en las que se utilizó una mezcla al 30 % de yuca.

4.1 Cultivos mixtos. Relación 1:1

4.1.1 *Endomycopsis fibuliger* / *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis*

En la figura 4.1 se muestra el crecimiento para estas dos cepas en los cuatro medios utilizados

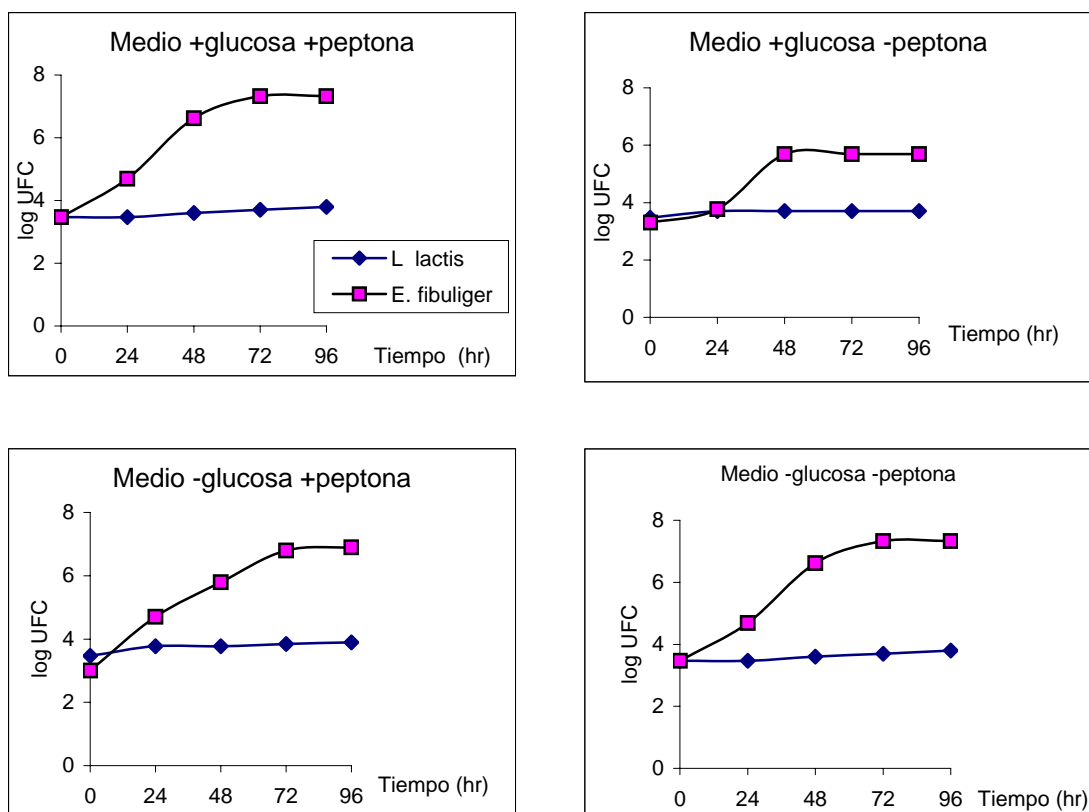


Fig 4.1 Crecimiento de *L. lactis* y *E. fibuliger* en cultivo mixto

La cepa de *E. fibuliger* tiene un desarrollo mayor en el medio en que se adicionó peptona y glucosa donde se presenta el mayor número de UFC. Por lo que respecta a la cepa de *L. lactis* el crecimiento es mínimo en los cuatro medios.

En la grafica 4.2 se muestran los productos obtenidos en los cuatro medios así como la variación de pH. La mayor concentración de ácido láctico fue la obtenida en el medio con peptona y con glucosa y fue 5 g/l.

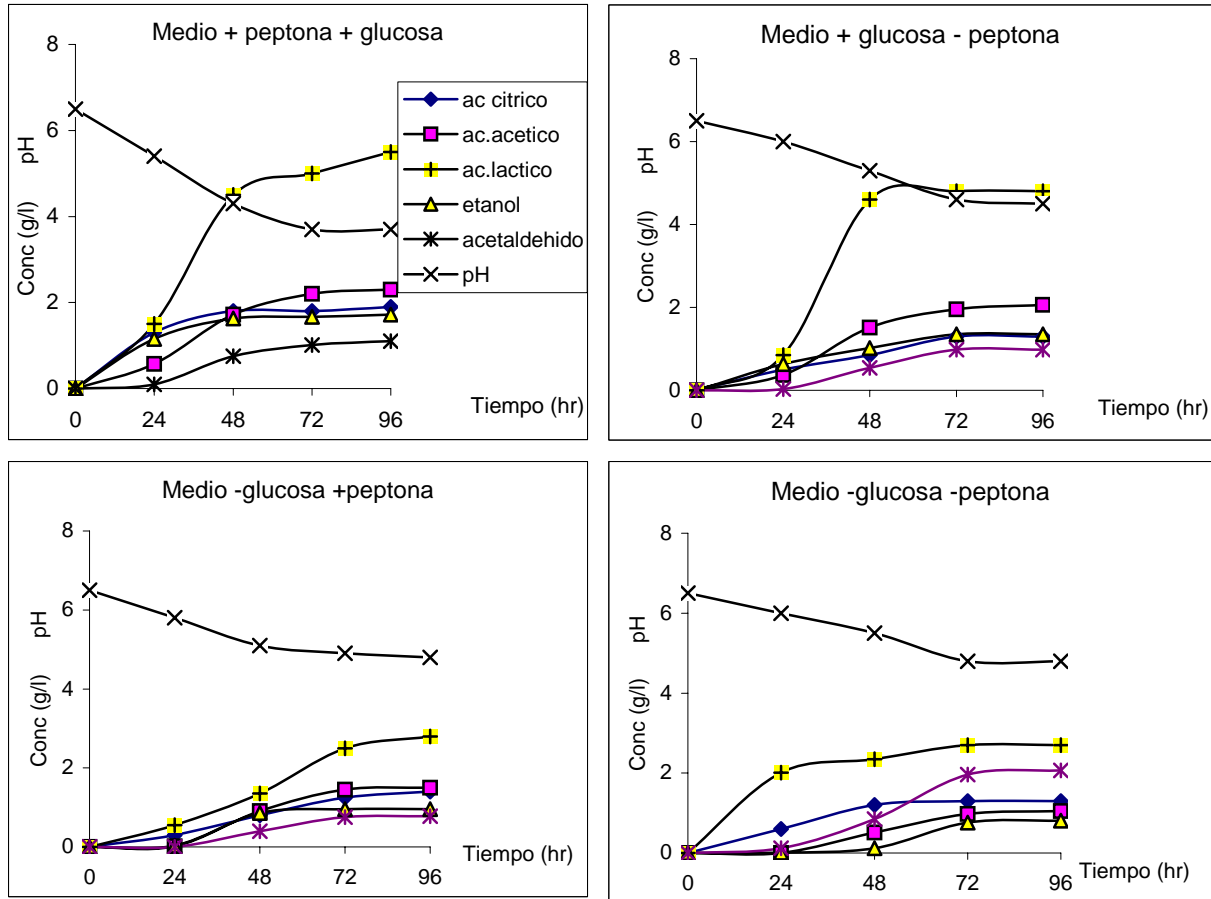


Fig 4.2 Evolución de compuestos generados y variación de pH en el cultivo mixto de *L. lactis* y *E. fibuliger*

La concentración de ácido acético obtenida en mayor concentración de 2 g/l se registró en el medio con glucosa y con peptona. El etanol se obtuvo en concentraciones alrededor de 1 g/l en todos los medios. Se cuantificó 2 g/l de acetaldehído en el medio sin peptona y sin glucosa. La concentración de ácido cítrico se obtuvo en casi 2 g/l en el medio con peptona y con glucosa. La caída del pH fue mayor en el medio con peptona y con glucosa al llegar a 3.7. Por lo que respecta al consumo de glucosa, el perfil mostrado en los cuatro medios se ilustra en la figura 4.3 como se puede observar. Después de 48 horas se presenta una concentración de hasta 7 g/l en el medio con glucosa y con peptona.

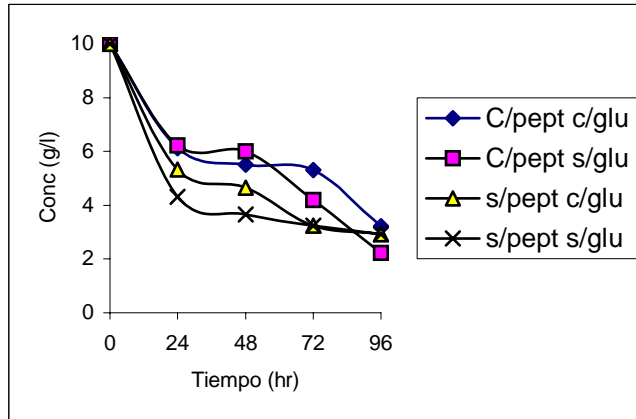


Fig 4.3 Evolución de glucosa en el cultivo mixto de *E. fibuliger* / *L. lactis*

Después de cuatro días de fermentación se detectaron concentraciones de más de 3 g/l en todos los medios.

4.1.2 *L. amylovorus* / *C. tropicalis*

En la figura 4.4 se muestran las UFC obtenidas en los cuatro medios.

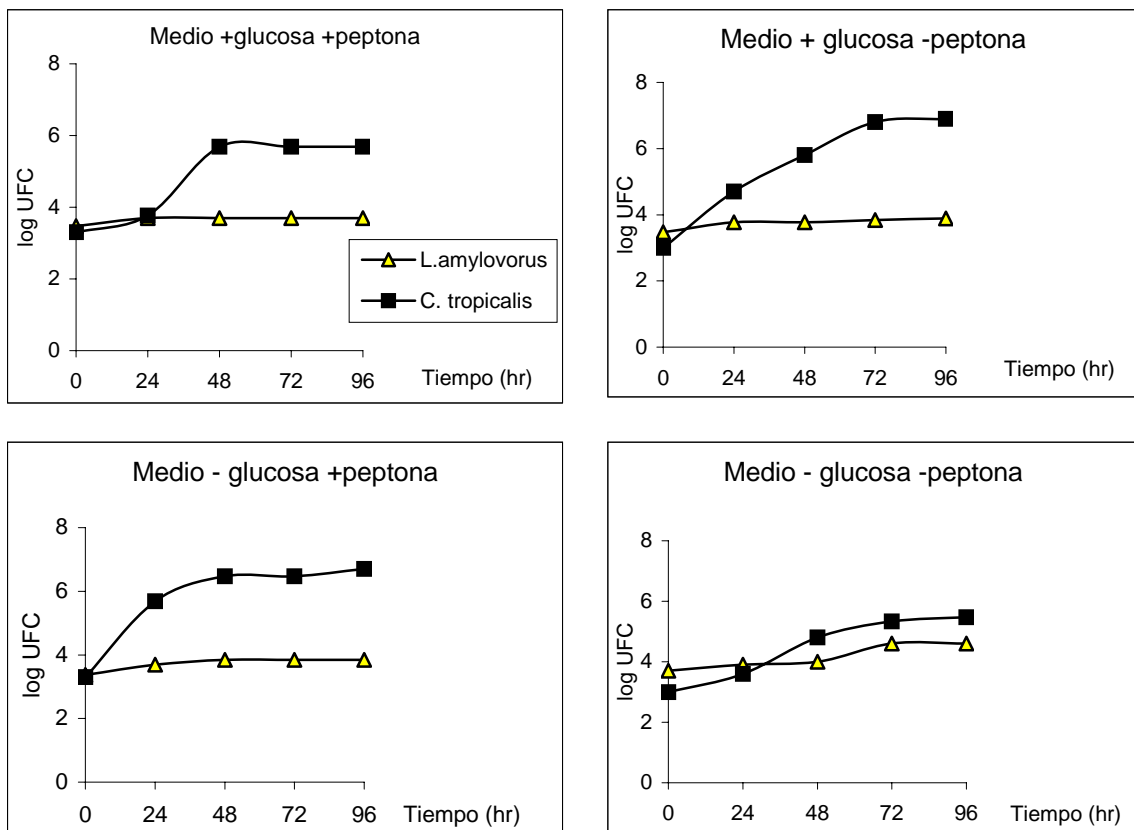


Fig 4.4 Crecimiento de *L. amylovorus* y *C. tropicalis* en cultivo mixto

En ambas graficas se observa que las UFC obtenidas mostraron curvas muy cercanas entre sí. En la figura 4.5 se muestran los compuestos obtenidos durante la fermentación en los cuatro medios, así como la variación del pH. La concentración de ácido láctico fue mayor en el medio sin peptona y sin glucosa alcanzando un valor de 5.6 g/l. Por lo que respecta al ácido cítrico se obtuvo la mayor concentración en los medios sin peptona, alcanzando un valor de 1.6 g/l en ambos medios.

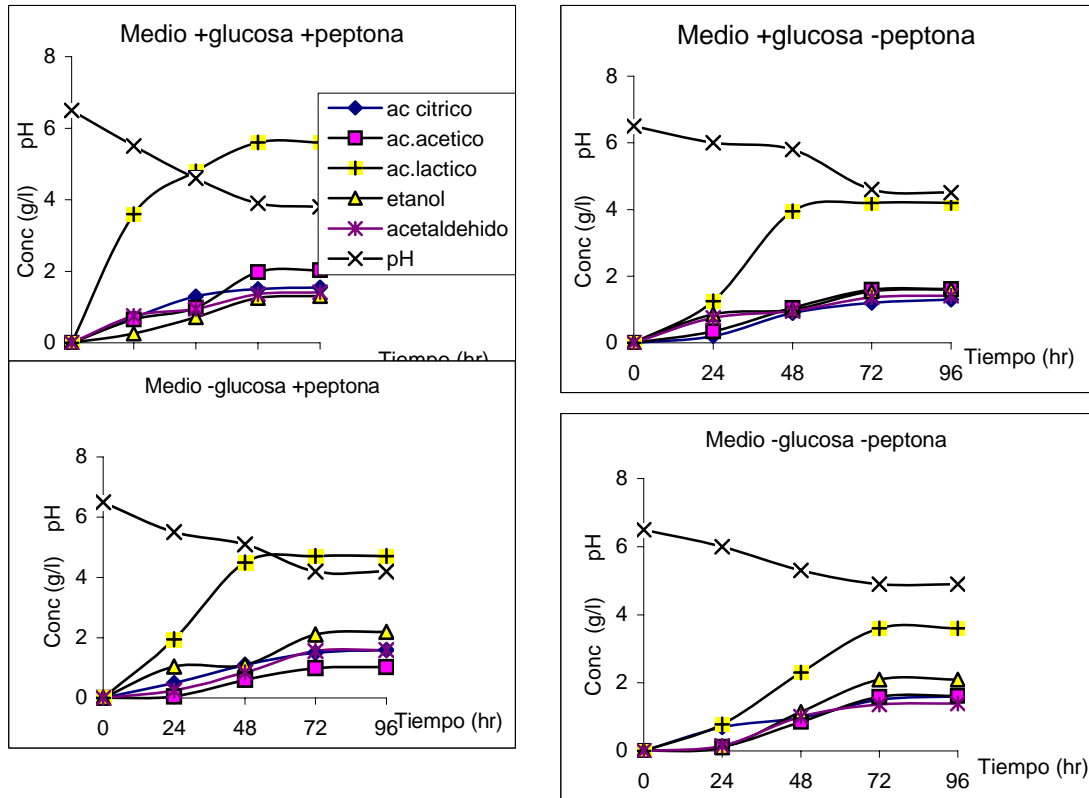


Fig 4.5 Evolución de compuestos generados y variación de pH en el cultivo mixto de *L. amylovorus* y *C. tropicalis*.

La mayor concentración de etanol se obtuvo en el medio sin peptona con glucosa y fue de 2.2 g/l. Por lo que respecta a la caída de pH en esta fermentación, fue mayor en el medio con peptona y con glucosa. El consumo de glucosa se muestra en la figura 4.6 para los cuatro medios utilizados.

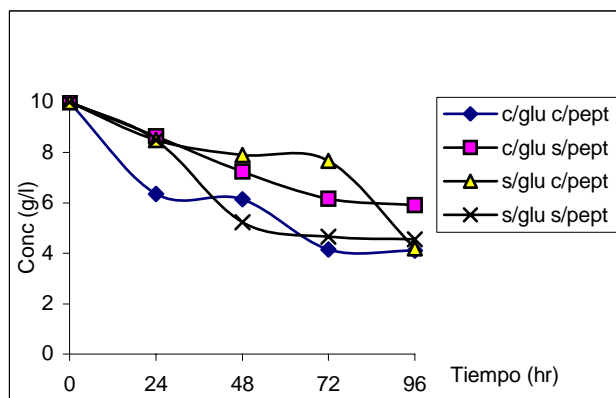


Fig 4. 6 Evolución de glucosa por *L. amylovorus*/*C. tropicalis*

4.2 Cultivos mixtos. Proporción 9:1

La intención de realizar estas fermentaciones fue favorecer a las bacterias lácticas con respecto a las levaduras, inoculando estas últimas en mayor proporción.

En esta etapa experimental, se graficaron las UFC y los valores de pH obtenidos durante la fermentación.

4.2.1 *Lactococcus lactis ssp lactis/ Endomycopsis fibuliger*

En la figura 4.7 se graficaron las UFC para ambos microorganismos.

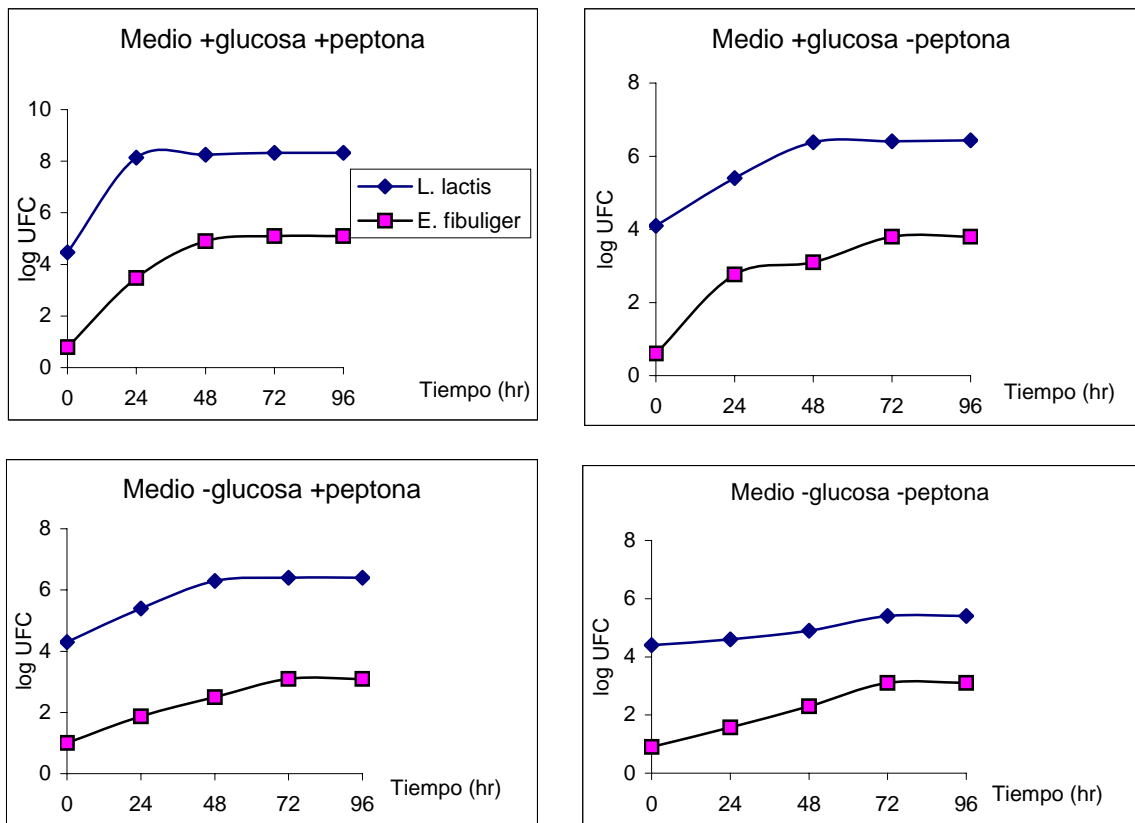


Fig 4.7 Crecimiento en cultivo mixto 9:1 de *L. lactis* y *E. fibuliger*

En la figura 4.8 se muestra la variación de pH en los cuatro medios utilizados.

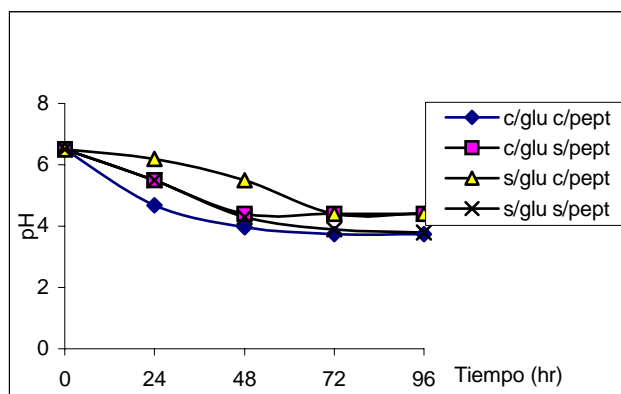


Fig. 4.8 Variación de pH por *L. lactis* / *E. fibuliger*, 9:1

La variación del pH es similar en los cuatro medios utilizados, obteniéndose un valor menor en el medio con peptona y con glucosa de 3.74, en tanto que el valor mayor fue de 4.4, en el medio sin peptona con glucosa y en el de peptona si glucosa.

4.2.2 *Lactobacillus amylovorus* / *Candida tropicalis*

En la figura 4.9 se muestran las UFC para estas cepas, en los cuatro medios utilizados.

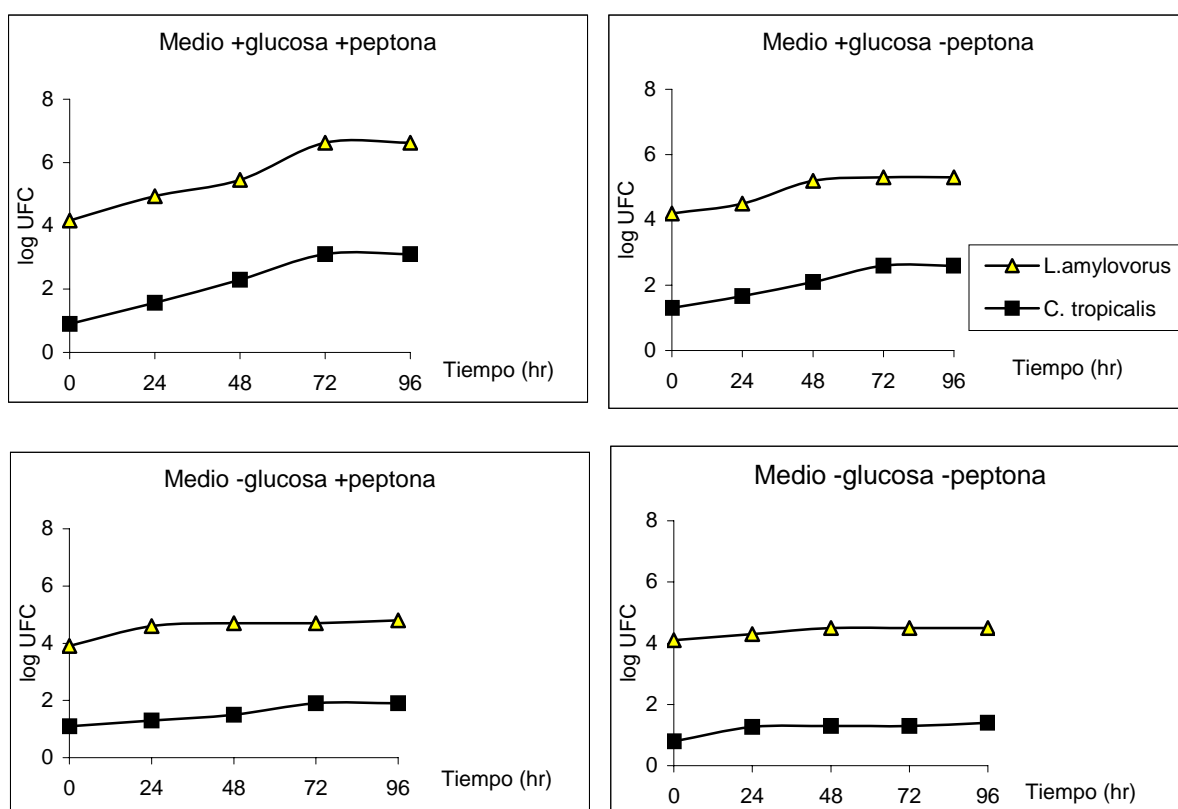


Fig 4.9 Crecimiento de *L. amylovorus* y *C. tropicalis* relación 9:1 en cultivo mixto e los medios utilizados

En estas fermentaciones la variación del pH se muestra en la figura 4.10.

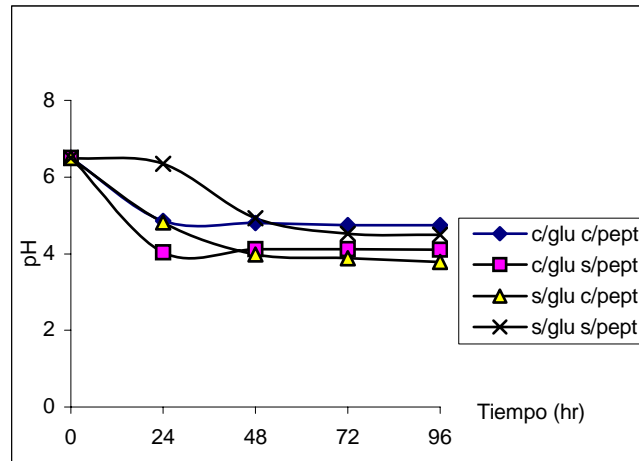


Fig 4.10 Variación de pH por *L. amylovorus* / *C. tropicalis* 9:1

4.3 Cultivos mixtos: Fermentación semisólida

En esta fase experimental, se comparó el crecimiento en el medio semisólido utilizando como variable la presencia o ausencia de las condiciones de esterilidad en el medio.

En estos experimentos se usó un medio con una concentración al 30% de yuca (p/v). Se manejó un inóculo con proporción de 9:1 de bacterias lácticas y levaduras, respectivamente.

4.3.1 *Lactococcus lactis* ssp *lactis*/ *Endomycopsis fibuliger*

Los resultados obtenidos en este experimento se muestra en la figura 3.11.

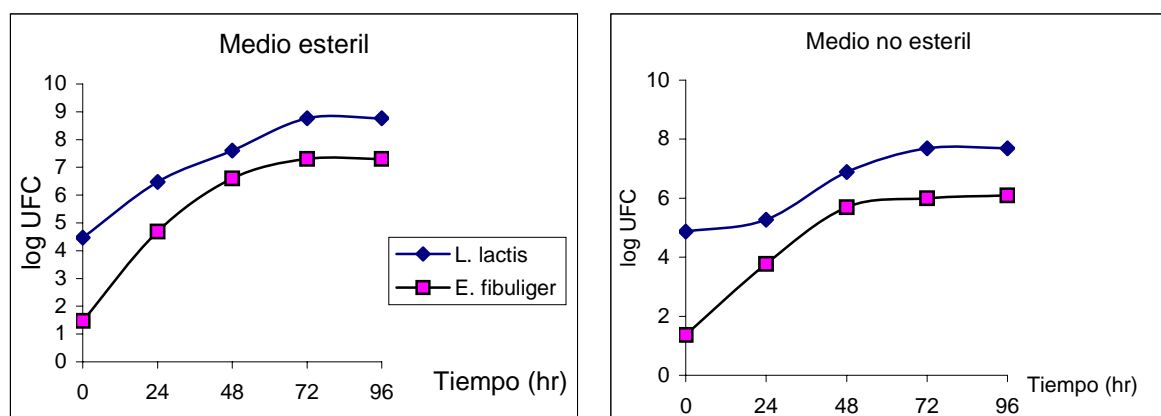


Fig 4.11 Crecimiento de *L. lactis* y *E. fibuliger* medio de yuca 30% en cultivo mixto 9:1

Se observa que en el medio con condiciones estériles se desarrolla un mayor crecimiento para ambas cepas.

En cuanto a la caída del pH, esta se ilustra en la figura 3.12 para ambos medios.

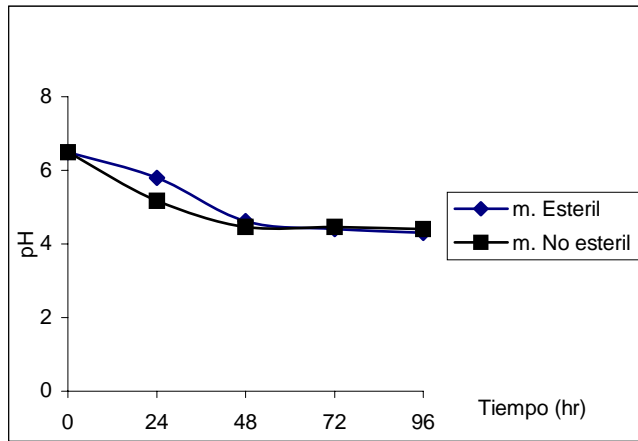


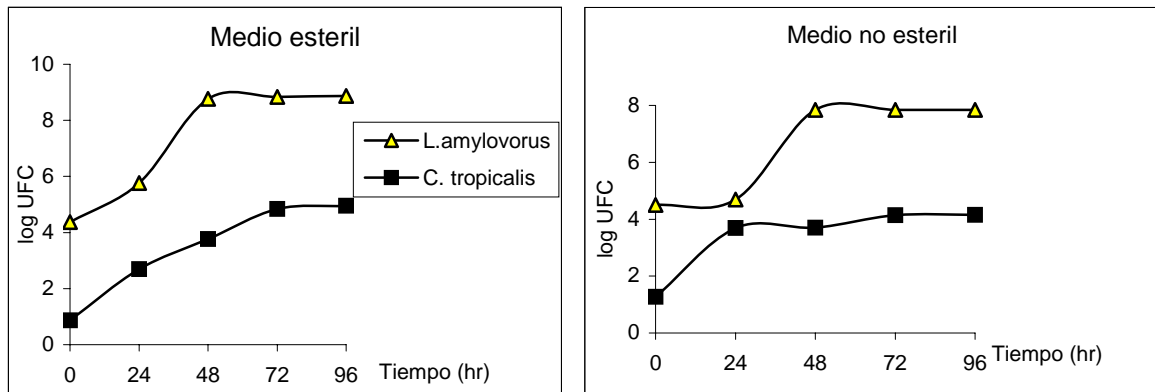
Fig 4.12 Variación de pH en fermentación semisólida: *L. lactis* / *E. fibuliger*

Se puede observar que la variación en el pH es similar en ambos medios. En los dos se llegan a valores de 4.4.

4.3.2 Lactobacillus amylovorus / Candida tropicalis

En la figura 4.13 se graficaron las UFC obtenidas para estas cepas.

Las UFC registradas muestran que se presentó un mayor desarrollo en el medio



estéril para ambos microorganismos.

Fig 4.13 Crecimiento de *L. amylovorus* y *C. tropicalis* 9:1 en cultivo mixto medio Yuca 30%

Por lo que respecta a la variación de pH, ésta se muestra en la figura 4.14

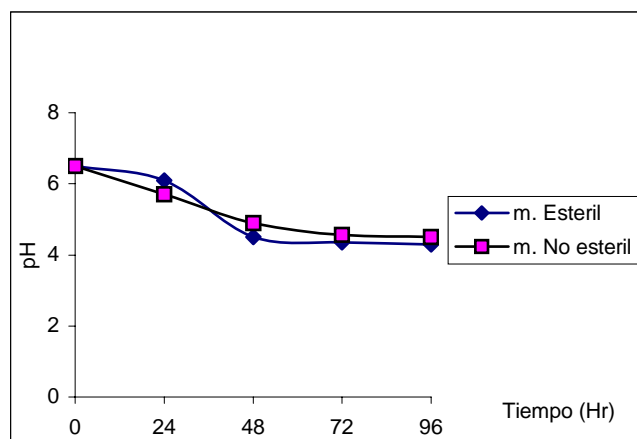


Fig 4.14 Variación de pH Fermentación semisólida: *L. amylovorus* / *C. tropicalis*

Como se observa, la variación de pH es similar en ambos medios. Se registra un valor de 4.3, en tanto que para el medio no estéril, se obtiene un valor de 4.4.

4.4 Cultivo mixto: fermentador

Se utilizó un fermentador para la siguiente etapa experimental. En este proceso, se consideró como variable la fijación de pH durante toda la fermentación. Por otra parte, se llevó a cabo un mayor número de muestras.

4.4.1 *Lactococcus lactis ssp lactis*/ *Endomycopsis fibuliger*

En la figura 4.15 se muestra las UFC obtenidas por estas cepas en fermentador.

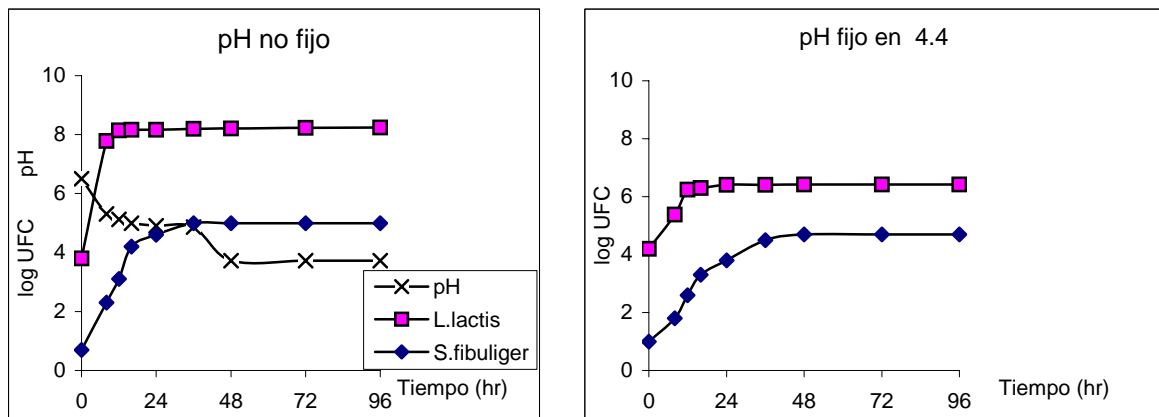


Fig 4.15 Crecimiento de *L. lactis* y *S. fibuliger* en cultivo mixto fermentador

En la figura 4.16 se muestra la variación del pH en el cultivo mixto en el fermentador.

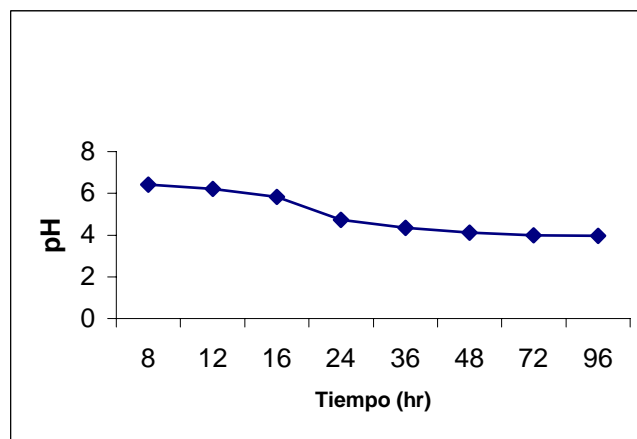


Fig 4.16 Variación de pH cultivo mixto *L. lactis* / *E. fibuliger* en fermentador

Como puede observarse, la variación de pH en el medio es similar a las pruebas realizadas en matraz. Se alcanza un valor de 4.3.

4.4.2 *Lactobacillus amylovorus* / *Candida tropicalis*

En la figura 4.17 se muestran las UFC obtenidas por estas dos cepas, en ambas condiciones experimentales.

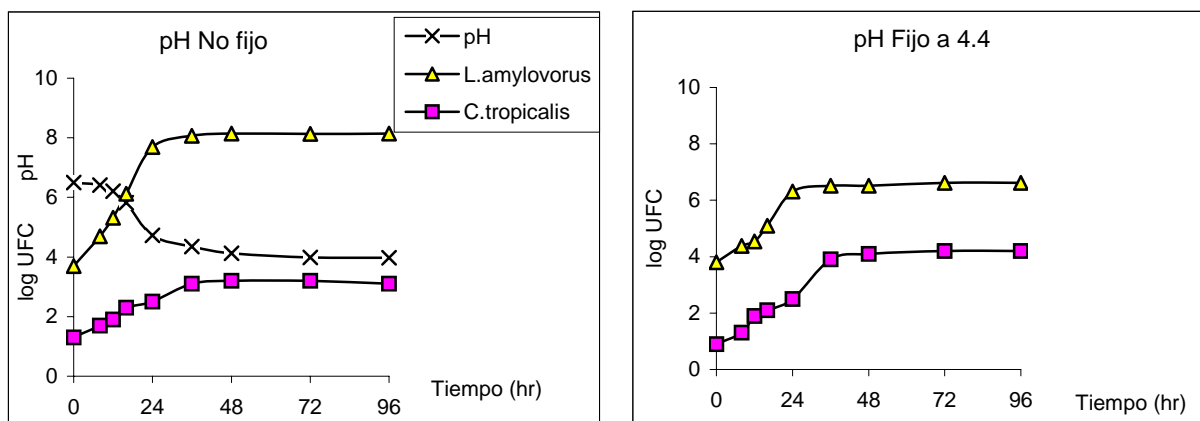


Fig 4.17 Crecimiento de *Lactobacillus amylovorus* / *Candida tropicalis* cultivo mixto utilizando un fermentador de 2.5 l.

Se observa en las gráficas que las levaduras tienen un crecimiento ligeramente mayor cuando se controló el pH. En tanto que ocurre lo contrario para las bacterias lácticas, en donde se presenta un número de UFC ligeramente mayor cuando no se controló el pH. En la figura 4.18 se muestra la variación de pH obtenido para esta combinación en el fermentador.

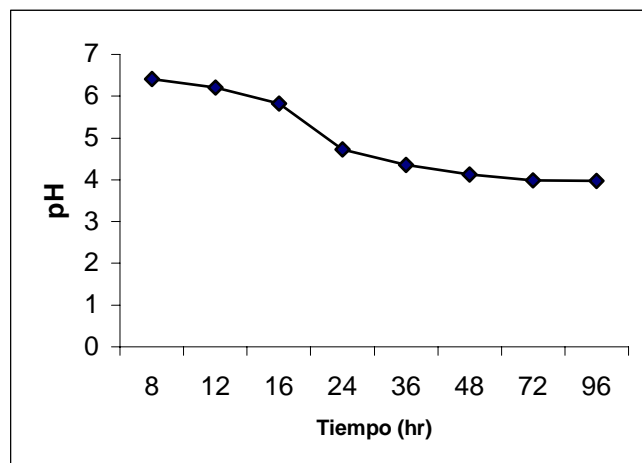


Fig 4.18 Variación de pH cultivo mixto *L. amylovorus* / *C. Tropicales* en Fermentador

Se observa una caída del pH hasta 3.97. En esta gráfica se ve que a las 48 horas de fermentación, el pH deja de presentar variaciones.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

Cultivos Puros

Se realizó una selección preliminar a partir de 6 bacterias lácticas y 8 levaduras, como puede observarse en la tabla 5.1. De estas cepas se seleccionaron 4 de cada una.

Bacterias lácticas	Levaduras
<i>L. lactis</i> <i>L. cremoris</i> <i>L. amylovorus</i> * <i>L. cellobiossus</i> * <i>L. plantarum</i> * <i>L. mesenteroides</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>C. pseudotropicalis</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>E. fibuliger</i> * <i>G. candidum</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. castelli</i> <i>D. castelli</i> *

Tabla 5.1 Cepas iniciales. * Especies con capacidad amilolítica.

Esta selección se basó en pruebas cualitativas en cajas petri, en las cuales las cepas amilolíticas tuvieron un crecimiento mayor a las cepas no amilolíticas. Cuando se adicionó una fuente extra de nitrógeno (peptona) al medio se favoreció el crecimiento de estas cepas.

L. lactis es una bacteria láctica que se utiliza con frecuencia en procesos de fermentación, sobre todo por su capacidad de disminuir el pH en el producto obtenido y aunque no se ha reportado en las fermentaciones tradicionales de yuca, puede ser considerada como una posibilidad interesante puesto que se le atribuye también la capacidad de generar aromas a mantequilla.

En el caso de *C. tropicalis* se presentó un crecimiento menor al obtenido por otras cepas de levaduras utilizadas en este proyecto. No obstante, este microorganismo se le encuentra con frecuencia en las fermentaciones tradicionales de la yuca, como la elaboración del “gari” y es a esta especie a la que se le atribuye el aroma característico de este producto africano, (Dogan et al., 1983).

Con respecto a las cepas amilolíticas como *L. amylovorus*, se obtuvo un crecimiento mayor, debido a su capacidad de degradar el almidón, sin embargo, no es una bacteria que se le haya reportado en alguna fermentación tradicional de yuca. Otra bacteria láctica amilolítica es *L. cellobiossus*. Esta cepa se desarrolla fácilmente utilizando el almidón de la yuca como única

fueron fuente de carbono y se le ha reportado en diferentes procesos fermentativos tradicionales (Sen, S. y S.L. Shacrabarty, 1984).

En la tabla 5.2. se muestra las cepas seleccionadas de cuatro bacterias lácticas y cuatro levaduras para la segunda fase experimental.

Bacterias lácticas	Levaduras
<i>L.amylovorus</i> <i>L.plantarum</i> <i>L.mesenteroides</i> <i>L.lactis</i>	<i>C.tropicalis</i> <i>S.cerevisiae</i> <i>E.fibuliger</i> <i>G.candidum</i>

Tabla 5.2 Cepas seleccionadas para la segunda etapa experimental (cultivos puros).

Las variables para estos experimentos fueron la presencia y ausencia de oxígeno para las levaduras y la adición o no de una fuente de nitrógeno que fue la peptona, tanto para bacterias como para levaduras.

En todas las fermentaciones realizadas se encontró que la adición de peptona al medio favoreció el crecimiento de levaduras y de bacterias lácticas, lo que se puede atribuir a que el contenido de nitrógeno en la raíz de yuca es muy bajo, ya que va de 1.8 a 5 g por cada kilogramo, dependiendo de la variedad (Montaldo, 1985).

Durante la fermentación fueron detectados diferentes compuestos mediante técnicas de cromatografía de líquidos (HPLC) y cromatografía de gases (CGL). Se cuantificaron con el objetivo de comprobar si podían ser considerados como una medida indirecta de crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que estos compuestos no pueden ser utilizados como una medida indirecta del crecimiento, debido a que las mayores concentraciones obtenidas de un compuesto determinado no correspondían con un mayor crecimiento del microorganismo. Por ejemplo, la concentración de etanol detectada durante la fermentación de levaduras fue mayor en el medio en que no se adicionó peptona y fue en este medio donde se observó un menor crecimiento.

Levaduras

Durante las fermentaciones de levaduras se identificaron y cuantificaron varios productos, el principal de ellos fue etanol, otros compuestos obtenidos fueron los ácidos acético y cítrico. Estos se forman durante el metabolismo intermedio y participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Lenhinger, 1980).

Al revisar los datos obtenidos se puede observar que se registró una mayor concentración de etanol para la cepa de *G. candidum*. Aunque en las fermentaciones realizadas por *S. cerevisiae*, se produce también etanol, la concentración es menor que la obtenida para *G. candidum*. Este microorganismo se ha detectado con frecuencia en las fermentaciones tradicionales de yuca (Lancaster et al, 1982), y es razonable pensar que tenga una mayor afinidad por este tipo de sustrato que en su mayoría es almidón hidrolizado y por ello se genere una mayor concentración de etanol. Por otra parte, juega un papel preponderante, sobre todo después de que han pasado uno o dos días de fermentación (Okafor et al., 1998), esto permitió trabajar con

una cepa que se desarrolla de manera natural en este sustrato utilizando condiciones más controladas.

En las bacterias lácticas se midió el producto principal: el ácido láctico y también fueron detectados etanol, acetaldehído y ácido acético. (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Con respecto al consumo de glucosa y después de cuatro días de fermentación no se detectó glucosa en el medio para la mayoría de las cepas. Sin embargo, para el caso de *E. fibuliger*, y se puede observar que aun después de 96 horas de fermentación, se midieron concentraciones altas de glucosa.

Aunque existe una fuente de glucosa disponible en el medio durante toda la fermentación para esta cepa, es probable que la fuente de nitrógeno en el medio sea el factor limitante del crecimiento y donde se agregó peptona al medio, el crecimiento fue mayor.

Por lo que respecta a la variación del pH, se puede observar una clara estabilización de la curva de pH a las 72 horas para las levaduras y a las 48 horas para las bacterias lácticas, al utilizarlo como una medida indirecta del crecimiento, se puede detectar que al alcanzar los valores menores, el crecimiento, ha alcanzado su valor más alto en todos los casos.

Revah y Méraz (1989) encontraron aromas afrutados después de la fermentación de la yuca, y aunque se considero que podría tratarse de ésteres, no fueron identificados. Durante las fermentaciones realizadas en este trabajo, por lo que respecta a *C. tropicalis* la principal característica que presentó después de la fermentación fue un aroma a piña. En el presente trabajo, este compuesto fue identificado como isoamil-formato mediante técnicas de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas. Este compuesto pertenece a un grupo de esterres que se generan a partir de carbohidratos o de aminoácidos dando lugar a oxo-ácidos, los cuales al acumularse en exceso, pueden ser descarboxilados generando el aldehído correspondiente, el cual posteriormente es reducido, dando lugar así a los llamados “fusel oil”. Se ha reportado que estos compuestos se detectan al final de la fermentación realizada por levaduras. Como se observa en la tabla 5.3 (Felder y Rosseau, 1990) se muestran algunos de los alcoholes amílicos con respecto a su porcentaje obtenido al final de la fermentación.

Alcoholes	% en peso
n-propilico	10.64
isobutilico	11.09
Amilico	21.27
isoamilico	54.27
hexilico	2.73

Tabla 5.3 Formación de “fusel oils” durante la producción de etanol.

Se pudo observar que tuvo un desarrollo intermedio entre las cepas amilolíticas y las que no se desarrollan de manera natural en la yuca.

La cepa de *E. fibuliger*, cuya característica principal es la de degradar el almidón, generó sustrato suficiente para su desarrollo y una cantidad extra que fue detectada durante toda la fermentación.

En la tabla 5.4 se muestran las concentraciones de compuestos obtenidas durante la fermentación de yuca por levaduras con y sin peptona.

Levadura	Etanol(g/l)		Ac. Cítrico		Ac. Acético		Glucosa	
	+pept	-pept	+pept	-pept	+pept	-pept	+pept	-pept
<i>E. fibuliger</i>	1.13	1.07	1.47	1.2	1.9	1.3	4.18	3.6
<i>C. tropicalis</i>	0.6	0.31	1.6	1.2	1.4	1.4	0.04	0.3
<i>G. candidum</i>	0.88	0.90	1.24	1.5	2.06	1.5	1.38	1.95
<i>S. cerevisiae</i>	0.88	0.7	1.15	0.84	2.5	1.4	0.74	0.93

Tabla 5.4 Concentraciones finales de compuestos obtenidos en la fermentación de la yuca por levaduras.

En los experimentos realizados con las levaduras se probó cómo afectaba la adición de una fuente de nitrógeno al medio con respecto al desarrollo de estos microorganismos. Lo que se pudo observar fue que cuando se agregó peptona al medio, en la mayoría de las cepas se incrementó ligeramente la concentración de los compuestos obtenidos, con respecto a las que no se agregó esta fuente de nitrógeno al medio.

La otra variable utilizada fue la presencia y ausencia de oxígeno en el medio. En los que no se usó oxígeno el desarrollo fue menor, también se detectaron menores concentraciones de compuestos al final de la fermentación.

Con respecto al cambio del pH en los diferentes medios, se pudo observar que existe una relación de la caída de este con respecto al incremento de la concentración obtenida de ácidos carboxílicos.

Bacterias lácticas

En las cepas de bacterias lácticas, el principal producto generado fue el ácido láctico, sin embargo, también se detectó acetaldehído, ácido acético y etanol. Se pudo observar que las cepas que generaron ácido láctico en mayor concentración fueron *L. lactis* y *L. amylovorus*.

Por otra parte, también se puede observar que es a las 48 horas de fermentación se alcanza la mayor concentración de este compuesto. En este caso se consideró como variable la adición o no de peptona al medio.

Con respecto al consumo de glucosa durante estas fermentaciones, se pudo observar un comportamiento similar al de las levaduras. La cepa con capacidad amilolítica, sobresale de las otras, presentando altas concentraciones de glucosa durante toda la fermentación, en tanto que las otras cepas han consumido casi toda esta fuente de carbono a las 72 horas.

El acetaldehído, un producto secundario del metabolismo de las bacterias lácticas, se obtuvo en concentraciones de 1 g/l, como puede observarse en la tabla 5.5. Por lo que respecta al etanol, se detectó en concentraciones menores a 1 g/l en todas las fermentaciones. En concentraciones pequeñas otorga al producto final un aroma a mantequilla, pero cuando su concentración es alta, se producen aromas desagradables en el producto final (Lees y Jago,

1978). En las fermentaciones realizadas no se detectó ningún aroma relacionado con este compuesto.

En cuanto a *L. mesenteroides*, presentó un comportamiento en el cual se generan concentraciones de ácido láctico de 5 g/l en el medio con peptona y de 4 g/l en el medio sin peptona. Esto muestra una menor concentración que la obtenida por *L. lactis*. También se detectó etanol en concentraciones menores a 0.5 g/l. Estas dos cepas son utilizadas en gran medida en la industria de fermentaciones lácticas, principalmente por su capacidad de modificar las propiedades organolépticas del producto final. (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Bact. láctica	Ac. láctico		Acetaldehído		Etanol		Glucosa	
	+pept	-pept	+pept	-pept	+pept	-pept	+pept	-pept
<i>L. lactis</i>	5.8	5.1	2.67	1.26	0.3	0.3	0.83	0.03
<i>L. mesenteroides</i>	5.0	4.0	1.16	1.23	0.76	0.56	0.19	0.5
<i>L. plantarum</i>	4.0	3.5	1.13	1.03	0.71	0.7	0.01	0.03
<i>L. amylovorus</i>	5.8	3.7	1.29	1.1	0.8	0.7	5.1	0.5

Tabla 5.5 Concentraciones finales de compuestos (g/l) obtenidos en la fermentación de la yuca por bacterias lácticas.

Se pudo observar que el crecimiento se detiene en el momento que el pH llega a su nivel más bajo.

Aunque se ha reportado que *L. plantarum* posee cierta capacidad amilolítica (Shamala y Sreekantiah, 1988), la cepa utilizada en estas pruebas no presentó ese comportamiento.

Durante las experiencias en las que se usó *L. amylovorus* se registraron concentraciones de ácido láctico similares a las obtenidas por *L. lactis*. Estas concentraciones fueron obtenidas debido a un mayor desarrollo de esta cepa y por consiguiente un incremento en este compuesto. Es importante mencionar que el número de UFC's registradas para *L. amylovorus* fue mayor en el medio con peptona. Para esta bacteria se observa que la fuente adicional de nitrógeno en el medio favorece el crecimiento.

Otro de los compuestos detectados y cuantificados fue el acetaldehído, este es un producto que proviene del metabolismo secundario de las bacterias lácticas.

El análisis estadístico demostró que con respecto al medio utilizado se presentan diferencias significativas, esto quiere decir que la fuente de nitrógeno adicional es un factor que modifica la concentración final de compuestos detectados.

En el caso de las levaduras, por lo que respecta al etanol no se presentaron diferencias significativas excepto para las interacciones de los microorganismos entre sí.

Con respecto a la glucosa, se pudo observar que en todos los casos se presentaron diferencias altamente significativas con respecto al crecimiento. Sin embargo, al realizar el análisis sin considerar las cepas amilolíticas, tanto de levaduras como de bacterias lácticas, no se presentaban diferencias significativas.

Selección de cepas para la realización de fermentaciones en cultivo Mixto

Después de realizar las pruebas en cultivos puros, se decidió establecer combinaciones en pares utilizando cepas amilolíticas y cepas generadoras de aromas.

En la Tabla 5.6 se muestran las combinaciones seleccionadas para la segunda etapa experimental.

Combinación 1	<i>L. lactis</i> / <i>E. fibuliger</i>
Combinación 2	<i>L. amylovorus</i> / <i>C. tropicalis</i>

Tabla 5.6 Microorganismos seleccionados para la tercera fase experimental.

Por lo que respecta a los compuestos generados durante la fermentación, se observó la presencia de los mismos que fueron obtenidos en el cultivo puro por estas cepas. En el medio sin peptona y sin glucosa fue en donde se presentaron las menores concentraciones. Esto confirma que en el medio al que se agregó peptona y glucosa se favoreció más el crecimiento y la obtención de productos finales.

Por otro lado, la glucosa presentó un perfil diferente al mostrado por todas las cepas en cultivo puro. Después de cuatro días de fermentación se registraron concentraciones de hasta 3 g/l en el medio. Esto quiere que al tratarse de una cepa con capacidad amilolítica, *E. fibuliger* esta generando una fuente de carbono que tanto la levadura como la bacteria láctica consumen, lo que se observa por las menores concentraciones de glucosa obtenidas en esta fermentación al compararlas por esta cepa amilolítica en cultivo puro. La concentración de glucosa que se registra al final de la fermentación muestra que la fuente de carbono no es el factor que limita el crecimiento. En la combinación 1 se observa que ambas cepas tienen un desarrollo de la siguiente manera: las levaduras tuvieron un crecimiento abundante en tanto que las bacterias lácticas crecen aún menos que en cultivo puro, o sea que se puede estar presentando una relación biológica de competencia por el sustrato, en donde las levaduras son las más favorecidas.

En el caso de la combinación 2 *C. tropicalis* / *L. amylovorus* se observa un menor número de UFC's para ambas cepas con respecto al cultivo puro. Para la primera es ligeramente menor, pero para *L. amylovorus* se observa una clara disminución en su crecimiento en general, se puede observar que la combinación no favorece el desarrollo de ambas cepas. Lo anterior puede explicarse debido a que ambas cepas compiten por el sustrato lo que hace que su desarrollo sea menor.

Por lo que respecta a la producción de ácido láctico, se pudo ver que la mayor concentración de este compuesto se registró en el medio con glucosa y peptona. No obstante, para la combinación 2, se alcanzan concentraciones menores de que en el cultivo puro.

En tanto, para los medios utilizados, fue el medio sin glucosa y sin peptona en el que se registró la mayor caída del pH, obteniéndose valores de 3.8, valores muy similares a los obtenidos en las fermentaciones de bacterias lácticas en cultivo puro.

Las curvas obtenidas para la glucosa fueron diferentes en los cuatro medios, registrándose valores después de 96 horas, de 3 g/l en el de peptona y glucosa y de menos de 2 g/l en los tres medios restantes. Es decir, que al final de la fermentación todavía existe una fuente de carbono disponible en el medio.

En esta combinación se observó que el crecimiento fue menor para la cepa amilolítica, en comparación con el cultivo puro, sin embargo, la degradación que ésta hace del almidón, permite que *C. tropicalis* se desarrolle como si estuviera en cultivo puro.

Al establecer una comparación entre ambas combinaciones se pudo observar que la combinación 1 tiene un mayor crecimiento de ambas cepas en un sustrato como es la yuca y aunque se presenta competencia por el sustrato y claramente la levadura es dominante en la fermentación, esto es, no impide el crecimiento de la bacteria láctica, por lo que ambas se desarrollan de forma similar al que presentaron en cultivo puro.

En cambio, en la combinación 2, al ser la bacteria láctica la que debe aportar la fuente de carbono al medio, debido a su capacidad amilolítica y al crecer pobremente en el sustrato, no permite el crecimiento de la levadura y lo que puede estar ocurriendo aquí es una competencia por el sustrato, pero ninguna cepa domina en el medio y ambas se desarrollan en menor cantidad que en cultivo puro.

Al realizar fermentaciones de cultivos mixtos se esperaba que hubiera un tipo de relación simbiótica de tipo comensal, esto es, que la cepa amilolítica generara una fuente de carbono adicional a la que consume y que esta fuera utilizada por la otra cepa y se pudiera de esta manera desarrollar sin afectarla, esto es lo que se puede observar en la combinación 1, en donde la levadura, degrada el almidón de la yuca y provee de una fuente de carbono tanto para su propio crecimiento como para el desarrollo de la bacteria láctica.

Por otra parte, lo que parece estar ocurriendo en la combinación 2 es una simbiosis del tipo competencia por el sustrato, en la cual ambas cepas presentan un crecimiento pobre en comparación con que se observó en condiciones de cultivo puro.

Después de observar que el desarrollo de las cepas de bacterias lácticas fue menor en los cultivos mixtos con respecto a los puros en ambas combinaciones, se determinó modificar la proporción de éstas en el inóculo inicial con la finalidad de favorecerlas durante la fermentación.

Para la combinación de *L. lactis* / *E. fibuliger*, en proporción 9:1, respectivamente, se detectó para la primera, un mayor número de UFC's en comparación con el obtenido en la proporción 1:1, inclusive es mayor que el que se obtuvo en el cultivo puro. El mayor crecimiento se presentó en los medios con peptona, esto es, al adicionar una fuente extra de nitrógeno al medio, se favorece considerablemente su crecimiento. Por lo que respecta a las levaduras se observó un menor número de UFC's en esta combinación, comparativamente a la proporción anterior, no obstante, su desarrollo es suficiente para degradar el almidón y generar un sustrato suficiente para sí misma y para la *L. lactis*, sin embargo, se pudo observar que fue en el medio con peptona y glucosa donde se registro el mayor crecimiento. Esto quiere decir que en esta proporción, *E. fibuliger* requiere de una fuente adicional de peptona y de glucosa en el medio para tener un mejor desarrollo. Por lo que respecta a la variación de pH, se detectó un comportamiento similar al observado en la proporción 1:1.

Se pudo observar claramente que en la proporción 1:1, las bacterias tienen un crecimiento mínimo y el medio es dominado por las levaduras. Cuando se utiliza la proporción 9:1, las bacterias presentan un mejor desarrollo, en tanto que las levaduras no se ven muy afectadas y presentan un crecimiento ligeramente menor que en la proporción anterior.

En la combinación *L. amylovorus* / *C. tropicalis* en proporción 9:1, sólo se registró un incremento en el número de UFC's para *L. amylovorus*, en el medio con peptona y glucosa; en los otros medios se detectó apenas un ligero crecimiento lo cual demuestra que es necesario adicionar al medio una fuente extra de nitrógeno y glucosa para que tengan un buen desarrollo.

Por lo que respecta a *C. tropicalis*, se cuantificó un menor número de UFC's que en la proporción 1:1 y que en el medio puro. Fue en los medios con peptona donde se presentó el mayor crecimiento. Esto significa que al utilizar esta proporción, si adiciona una fuente extra de nitrógeno, se presenta un desarrollo mayor para esta levadura. Por otra parte, la caída del pH en el medio es similar a los valores registrados en las fermentaciones con proporción 1:1.

Al modificar el inóculo inicial se pudo observar que se favorecían las bacterias lácticas en ambas combinaciones. Es probable que al variar la proporción del inóculo ya no se esté presentado interacciones biológicas del tipo de competencia, sino una comensal, en la cual, una cepa se desarrolla a partir de otra, pero sin afectarla.

La siguiente etapa experimental consistió en realizar fermentaciones en condiciones estériles y no estériles. Esto se llevó a cabo con la finalidad de simular condiciones de una fermentación tradicional, comparando el crecimiento con las condiciones de laboratorio. En estas pruebas se utilizó la proporción 9:1 de bacterias lácticas y levaduras, respectivamente.

En la combinación 1 se registró un mayor número de UFC's en condiciones estériles tanto de levaduras como de bacterias lácticas, en comparación con las condiciones no estériles. Un aspecto importante es que en estas fermentaciones se detectó un crecimiento similar al presentado en los cultivos puros para ambos microorganismos, sobre todo considerando que a estos medios no se agregó ninguna fuente extra de nitrógeno ni de glucosa, esto permite considerar fermentaciones de cultivos mixtos en este sustrato como única fuente de carbono. El incremento en el número de UFC's puede atribuirse a una mayor cantidad de sustrato disponible en el medio.

En la combinación 2 en condiciones estériles, se presentó un crecimiento similar al obtenido en medio líquido, sin embargo en condiciones no estériles el crecimiento fue mucho menor.

En estas fermentaciones, en condiciones no estériles se presentó un crecimiento menor para ambas combinaciones. En este caso se pudo detectar contaminación por otros microorganismos, lo cual pudo contribuir al menor desarrollo de las cepas originales. Los valores detectados en condiciones estériles son cercanos a lo obtenidos en fermentaciones tradicionales en los cuales aparecen cultivos mixtos de bacterias lácticas y levaduras, (Little et al., 1993). Por lo que respecta al pH se presentó un comportamiento similar en ambos medios, llegando al mismo valor después de cuatro días de fermentación. La variación en el pH fue similar en ambas condiciones, hasta llegar a niveles de 4.

El problema principal que se presentó en las fermentaciones no estériles es la contaminación por otros microorganismos, que modifican las propiedades del producto final. Aquí es importante volver a mencionar que los aromas afrutados que fueron generados por ambas

combinaciones al final de la fermentación ya no se presentaban en condiciones no estériles. Por lo que, si se busca un mayor crecimiento y la presencia de estos aromas que modifican las propiedades organolépticas del producto final es importante trabajar en condiciones estériles.

Al comparar estas combinaciones se mostró que ambas se ven favorecidas por las condiciones estériles, no obstante la combinación 1 tuvo un mayor desarrollo que la 2, debido posiblemente a que la levadura amilolítica es más efectiva al degradar el sustrato que la bacteria láctica amilolítica.

La última prueba experimental consistió en utilizar un fermentador de 2.5L de capacidad. La finalidad de estos experimentos fue comparar el crecimiento de ambas combinaciones con la variable de poder fijar el pH en el medio durante toda la fermentación. Otro aspecto interesante de esta fase experimental fue la posibilidad de obtener muestras con menores intervalos de tiempo.

En la combinación 1 se detectó un mayor crecimiento para *L. lactis* en el medio donde no se controló el pH, detectándose valores de UFC's semejantes a las obtenidas en matraz, es decir, que esta cepa si se ve afectada en su desarrollo si es controlado el pH desde el inicio, dándose valores de crecimiento menores. En tanto, para *E. fibuliger* se presentó un crecimiento similar en ambas condiciones y también semejante al obtenido a las fermentaciones realizadas en matraz. Esto es, esta cepa no se ve afectada por mantener fijo el pH durante la fermentación y se presenta un comportamiento similar en matraz como en el fermentador.

Para la combinación de 2 se detectaron valores de UFC's menores a los que se registraron en las pruebas realizadas en matraz para las dos cepas, aunque se presentó ligeramente mayor crecimiento en el medio donde no se fijó el pH. No obstante, el crecimiento tanto de *L. amylovorus* como de *C. tropicalis* en estas pruebas fue semejante a las pruebas en matraz donde no se utilizó una fuente adicional de peptona y de glucosa.

En esta combinación, aunque *L. amylovorus* tiene un crecimiento menor, sigue degradando almidón y generando sustrato para para su crecimiento como para el desarrollo de *C. tropicalis*, esto muestra un tipo de simbiosis en la que un microorganismo se desarrolla a expensas de otro, pero no lo daña ni lo afecta en su crecimiento. Este tipo de interacción se denomina comensalismo.

La combinación de *L. lactis* y *E. fibuliger* se desarrolló mejor en todas las fermentaciones, por lo cual se recomienda utilizar una combinación de una levadura amilolítica y una bacteria láctica no amilolítica, esta última que pueda modificar las propiedades organolépticas del producto final.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Durante el presente proyecto, se realizó una selección de 14 microorganismos, bacterias lácticas y levaduras para ser utilizados en pruebas de fermentación en yuca. Después de realizar una primera selección con base en su desarrollo en pruebas cualitativas en yuca, se contó con 4 levaduras y 4 bacterias lácticas, con estas cepas se realizaron experimentos en los que se probó la presencia y ausencia de oxígeno (levaduras) y de una fuente de nitrógeno, la peptona (levaduras y bacterias).

La adición de una fuente extra de nitrógeno al medio, fue necesaria para favorecer el crecimiento de las cepas, sobre todo en el caso de las bacterias lácticas

La variación en el pH fue similar en las fermentaciones de levaduras llegando a valores de 4.4 –4.5 después de cuatro días. En cuanto a las bacterias lácticas se registraron valores entre 4.0. – 3.5. Lo que es importante enfatizar es que en ambos tipos de microorganismos se obtiene una disminución en el pH, debido a la producción de ácidos carboxílicos.

Con base en las pruebas anteriores, se realizó una nueva selección, se decidió trabajar con las combinaciones siguientes: 1. *Lactococcus lactis ssp lactis biovar diacetylactis* con *Endomycopsis fibuliger* o *S. fibuliger* (cepa de bacteria láctica utilizada para modificar propiedades organolépticas de la leche y cepa de levadura amilolítica); 2. *Lactobacillus plantarum* con *Candida tropicalis* (bacteria láctica amilolítica y levadura generadora de aromas).

Los cultivos mixtos de bacterias lácticas y levaduras utilizados en un sustrato amiláceo como es la yuca generaron nuevas propiedades organolépticas al producto final, se obtuvieron brindando aromas afrutados que correspondieron a los ésteres formato de isoamilo y acetato de isoamilo, los cuales fueron detectados en el medio. También fueron identificados los ácidos carboxílicos: acético, láctico, cítrico; otros compuestos fueron etanol, acetaldehído. Es posible seguir estos compuestos durante la fermentación mediante técnicas de HPLC y CGL.

Durante las fermentaciones en cultivo mixto, se detectó el mayor crecimiento en los medios a los que se adicionó una fuente extra de nitrógeno y de glucosa. En estos experimentos las levaduras tuvieron un crecimiento ligeramente mayor al que presentaron en cultivo puro, en tanto que las bacterias lácticas tuvieron un desarrollo mucho menor que en cultivos puros, por lo cual se decidió favorecerlas al modificar la proporción del inóculo inicial a 9:1 de bacterias lácticas y levaduras, respectivamente.

En estas fermentaciones, se registró un mayor crecimiento de las bacterias lácticas que el presentado en la proporción 1:1. Por lo que respecta a las levaduras, se redujo su crecimiento. Por lo que puede decirse que la modificación en la proporción inicial de 9:1 de bacterias lácticas y levaduras favorece el crecimiento de las primeras en el cultivo mixto.

Se detectó que en condiciones de esterilidad, en un medio con 30% peso/volumen de yuca como único sustrato, se favorece el crecimiento de las cepas inoculadas, en tanto que se siguen presentando aromas agradables afrutados en la fermentación.

Por otra parte, cuando las condiciones no son estériles, se disminuye el desarrollo de estas cepas sobre todo porque se presenta contaminación por otro tipo de microorganismos como hongos y otras bacterias y por consiguiente, no se obtienen aromas afrutados.

Inicialmente, las pruebas en medio líquido se llevaron a cabo en matraces con 50 ml de medio, posteriormente se escaló a un fermentador de 2.5 L de capacidad. Después de realizar este escalamiento se detectó que se presentaba un crecimiento similar al obtenido en matraz para la combinación 1, en tanto que en la combinación 2 se presentó un menor crecimiento. Esto ocurrió debido a que en estas pruebas se utilizó la yuca como único sustrato disponible y como ya se había mencionado, para *L. amylovorus*, su crecimiento se ve favorecido si es adicionada una fuente de nitrógeno en el medio.

En este escalamiento se fijó el pH para unos experimentos, esto permitió observar que en los experimentos donde se fijó el pH, se presentó un menor crecimiento tanto de bacterias lácticas como de levaduras en ambas combinaciones. Sin embargo, las más afectadas al mantener fijo el pH fueron las bacterias lácticas.

Finalmente, se puede concluir que la mejor combinación resultó ser la 1, *L. lactis* / *E. fibuliger*, pues presentó un mayor crecimiento en todos los medios y aunque ambos generaron aromas afrutados al final de la fermentación, esta combinación tiene menores requerimientos y puede crecer usando como única fuente de carbono la yuca.

Durante la fermentación de la yuca utilizando cultivos mixtos mixtos, se presentan interacciones biológicas entre las especies. Una de ellas es la que ocurre entre el microorganismo amilolítico que degrada el almidón de la yuca generando fuentes de carbono más fáciles de aprovechar y que facilitan el crecimiento de la cepa no amilolítica. Esto es, una especie se ve favorecida por otra sin afectarla en su desarrollo. Otra interacción biológica que se presentó fue la competencia por el sustrato. Estos tipos de interacciones pueden ser utilizadas para modificar el resultado final de la fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Amoa-Awua, W.K., F.E. Apoooh & M. Jacobsen 1996. *Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima*. Int. J. Food Microbiol. 31(1-3):87-98
- Bednarski, W., L. Jedrychowski, E.G., Hammond y Z. L. Nicolov. 1989. *A Method for the Determination of (-Dicarbonyl Compounds)*. J. Dairy Sci. 72: 2474-2477.
- Bouzas, J., C.A. Kant, F. Bodyfelt y J.A. Torres. 1991 *Simultaneous Determination of Sugars and Organic Acids in Cheddar Cheese by High Performance Liquid Chromatography*. J Food Sci 56(1): 276-278.
- Brian, J.B., W. Hodge y M.M. Hodge. 1985. *Yeast-Lactic Acid Bacteria Interactions and their contribution to Fermented Foodstuffs*. En Microbiology of Fermented Foods. Vol I. B.J.B. U.S.A. pp 263-293.
- Bull, T.A. 1983. *Mixed culture and Mixed Substrate*. En Biotechnology U.S.A. Ch. 5. Pp. 1345-1384.
- Caplice, E. y G.F. Fitzgerald. 1999 *Food fermentations; role of microorganisms in food production and preservation*. I. J. Food Microbiol. 50, 131-149.
- Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, Dixon AG. 2004 *Cassava breeding: opportunities and challenges* Plant Mol Biol. 56(4):643-59
- Cogan, T.M., M. O'Dowd y D. Mellerick, 1981. *Effects of pH and sugar on Acetoin Production from Citrate by Leuconostoc lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 41(1): 1-8.
- Cogan, T.M. 1983. *Some Aspects of the Metabolisms of Dairy Starter Cultures*. Ir. J. Food. Sci, Technol. 7: 1-13.
- Collins, E.B. 1972. *Biosynthesis of Flavor compounds by Microorganisms*. J. Dairy Sci. 5(7): 1022-1028.
- Collins, E.B. 1976. *Influence of Medium and Temperature on End Products and Growth*. J. Dairy Sci 60(5): 799-808.
- Cooke, R.D. 1987. *Composition of foods: analysis of Residual Cyanide in Cassava Foods*. Food Lab. Newsletter, 9: 18-21.
- Corbishley, D.A. y W. Miller. 1984. *Tapioca, Arrowroot and Sago Starches Production*. En Starch, Ch. XIII, Acad. Press, 469-478.
- Daugulis, A. 1989. *Fermentation Protocols for the Nutritive Upgrading and Detoxification of Cassava*. Final Meeting report to The International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Doku, E.V. 1969. *Cassava en Ghana, Accra, Ghana University Press, 44p*.
- Dougan, J., J. M. Robinson, s. Sumar, G.E. Howard y D.G. Coursey. 1983. *Some Flavouring Constituents of Cassava Processed Foods*. J. Sci. Food Agric. 34: 878-884.
- Doyon, G., G. Gaudreau, D. St-Gelais, Y. Beaulieu y C.J. Randall. 1991. *Simultaneous HPLC Determination of Organic Acids, Sugars and Alcohols*. Can Ins. Sci. Technol. J. 24(1/2): 87-94.
- Dziezak, J.D. 1986. *Biotechnology and Flavor Development: an Industrial Research Perspective*. Food Technol: 108-113.
- Etejere, E.D. y R.B. Bhat. 1985. *Traditional Preparation and uses of Cassava*. En Nigeria. Econ.Bot. 39(2): 157-164.

- Fleet, G.H., S. Lafon-Lafourcade y P. Ribéreau-Gayon 1984. *Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bourdeaux Wines*. Appl. Environ. Microbiol. 48(5): 1034-1038.
- Giraud E., A. Brauman, S. Keleke, B.Lelong y M. Raimbault. 1991. *Isolation and Physiological Study of an Amylolytic strain of Lactobacillus plantarum*. App. Microbiol Biotechnol 36: 379-383.
- Gunasekaran, P. 1989. *Improvement of the nutrient qualities of cassava fermented end-products*. Final Meeting Report to The International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Hosono, A., J.A. Elliot y W.A. Mcgug. 1974. *Production of ethyl esters by some lactic acid and psychrotrophic bacteria*. J. Dairy Sci 61(4): 535-539.
- Ikedibi, C.O., G.O.C. Onyia y C.E. Eluwah. 1980. *A rapid and inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava (Manihot esculenta crantz) and cassava products*. Agric. Biol. Chem. 44(12): 2803-2809.
- Janssens, J. 1980. *Production de manioc enrich en protéines par fermentation*. Ph.D. Thesis, universite de Technologie de Campiegne, France. 128 p.
- Jay, J.M. 1982. *Antimicrobial properties of diacetyl*. Appl. Environ. Microbiol. 44(3): 525-532.
- Kaneko, T., H. Suzuki y T. Takahashi. 1986. *Diacetyl formation and degradation by (Streptococcus lactis subsp. diacetylactis)*. Agric. Biol. Chem. 50(10): 2639-2641.
- Kemdirin, O.C., O.A. Chukwu & S.C. Achinewhu. 1995 *Effect of traditional processing of cassava on the cyanide content of gari and cassava fluor*. Plant Foods for Human Nutr. 48: 335-339.
- Kempler, G.M. 1983. *Production of flavor compounds by microorganisms*. Adv Appl Microbiol 29: 29-51.
- Kilara, A. y K.M. Shomani 1978. *Lactic fermentations of dairy foods and their biological significance*. J. Dairy Sci. 61: 1793-1800.
- Kimario, V.M., G.A. Massawe, N.A. Olasupo & W.H. Holzapfel. 2000. *The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of Òkivunde, a traditional Tanzanian food product*. I. J. Food Microbiol. 56: 179-190.
- Kreger-Van Rij, N.J.W. 1984. *The Yeast: A taxonomic study*. 3a.ed., Elsevier Science Publishers Amsterdam. 1982 p.
- Lafon-Lafourcade, S., E. Carre y P. Ribreau-Gayon. 1983. *Ocurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines*. Appl. Environ. Microbiol. 46(4): 874-880.
- Lancaster, P.A., M.Y. Lim y D.G. Coursey. 1982. *Traditional cassava-based foods: survey of processing techniques*. Econ. Bot. 36(1): 12-45.
- Lees, G.J. y G.R. Jago. 1978. *Role of acetaldehyde in metabolism: A review The metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products*. J. Dairy Sci. 61(9): 1216-1223.
- Lemaresquier, P. 1987. *Interrelationships between strains of (Saccharomyces cerevisiae) from the Champagne area and lactic acid bacteria*. Lett. Appl. Microbiol. 4: 91-94.
- Merory, J. 1968. *Food flavorings. Composition manufacture and use*. The Avi Publ. Co. Inc. USA.

- Miyamoto, T. G.G. Simon, T. Akimoto y T. Nakae. 1986. *Identification and properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented beverages in east Africa*. Jpn. J. Zootech Sci. 57(3): 265-276.
- Montaldo, A. 1985. La Yuca o mandioca Edit. IICA. Costa Rica 250pp.
- Moorthy, S.N. y Mathew, G. 1998. *Cassava Fermentation and Associated changes in Physicochemical and Functional Properties*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38(2): 73-121.
- Nakamura, L.K. 1981. *Lactobacillus amylovorus, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste corn fermentations*. Inter. J. Sys. Bact. 31(1):56-63.
- Narendranath, N.V., S. H. Hynes, K.C. Thomas y W.M. Ingledew. 1997. *Effects of Lactobacilli on yeast catalized Ethanol fermentations*, Appl and Environ Microbiol 4158-63.
- Nche, P.F. G.T. Odamtten, M.J.R. Nout & F.M. Rombouts. 1996 *Soaking determines the quality of aflata for kenkey production*. J. Cereal Sci. 24:291-297.
- Negrón-Mendoza, A. y R. Navarro González. 1982. Determinación de ácidos carboxílicos por cromatografía de gases. Informe técnico, Q-12-82, C.E.N., UNAM.
- Ngaba, P. R. y J.S. Lee. 1979. *Fermentation of cassava (Manihot sculenta Crantz)*. J. Food Sci. 44: 1570-1571.
- Ngaba, P. R. 1983. *Fermentation of cassava: New techniques*. J. Food Sci. 48: 1230-1236.
- Nout, M.J.R. & P.K. Sarkar. 1999 *Lactic food fermentation in tropical climates*. Antoine Van Leeuwenhoek. 70. 393-401
- Odufa, S.A. 1985. *African fermented foods in: Microbiology of fermented foods*. Vol 2 pp. 155-191.
- Okafor, N. 1989. *Some microbiological aspects of cassava fermentation with emphasis on detoxification of the fermented end-product*. Final Meeting Report to the international atomic energy Agency, Vienna.
- Okezie, B.O. y F.V. Kosikowski. 1981. *Acid Whey powder modification of gari from cassava*. J. Dairy Sci. 64: 416-421.
- Olukuyode, O.A. y O.a. Ogunsina. 1987. *Extracellular amylase production by cassava-fermenting bacteria*. J. Ind. Microbiol. vol 2: 123-127.
- Pardo, I., M.J. García, M. Zuñiga y F. Uruburu. 1989. *Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the tiel-requena region of Spain*. Appl. Environ. Microbiol. 55(2): 539-541.
- Pearson, D. 1971. The chemical analysis of foods. Chem Publ. Co. New York: 604 pp.
- Pérez-Gavilán, J. y J.P. Pérez-Gavilán. 1984. Bioquímica y microbiología de la leche. Limusa, México, D.F., 195 pp.
- Querol, A., M. Jiménez y T. Huerta. 1990. *Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain)*. J. Food Sci. 55(6). 1603-1605.
- Raimbault, M. 1988 *Starch hydrolysis by amylolytic Lactobacillus and utilization in solid fermentation of cassava*. Joint RILS/RIFA.

- Reddy, N.S. y b. Ranganathan. 1985. *Effect of time, temperature and pH on growth and production of antimicrobial substances by (Streptococcus lactis subsp. diacetylactis)*. *Milchwissenschaft*. 40(6): 346-348.
- Revah, S. y M. Meraz. 1989. *Application of pure strains to standardize the acidification process and the amyolytic activity in cassava fermentation*. Final Meeting Report to the International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Sandine, W.E. 1977. *New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance*. *J. Dairy Sci.* 60(5): 822-828.
- Schmitt, P., C. Davies y R. Cardona. 1992. *Origin of end-products from the co-metabolism of glucose and citrate by (Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris)*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 679-683.
- Schwarzenbach, R. 1982. *High performance liquid chromatography of carboxylic acids*. *J. Chrom.* 251: 339-358.
- Sen, S. y S.L. Shacrabarty. 1984. *Amylase from Lactobacillus cellobiosus isolated from vegetable wastes*. *J. Ferm. Technol.* 62(5): 407-413.
- Shamala, T.R. y K.R. Sreekantiah. 1988. *Fermentation of starch hydrolysates by (Lactobacillus plantarum)*. *J. Ind Microbiol.* 3: 175. 178.
- Sharpe, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*. En *The Procaryotes*. Ch. 131, Springer-Verley Berlin, 1654-1679.
- Shaw, P.E. y C.W. Wilson. 1981. *Determination of organic acids and sugars in loquat (Eriobotrya japonica Lindl.) by high pressure liquid chromatography*. *J. Sci. Food Agric.* 32: 1242.1246.
- Shriner, R.L., R.C. Fuson y D.Y. Curtin. 1966. *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Limus-Wiley, México, D.F. 479 pp.
- Sugihara, T.F. 1985. *Microbiology of breadmaking*. En *Microbial Ferm Foods*, Ch. 6: 249-259.
- Thomas, R.D. y K.W. Turner. 1981. *Carbohydrate fermentation by (Streptococcus cremoris) and (Streptococcus lactis) in agar gels*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(6): 1289-1294.
- Tubb, R.S. 1986. *Amyolytic yeast for commercial applications*. Elsevier, Sci. Pub. Amsterdam, pp 98-104.
- Vaughn, R.H. 1985. *The microbiology of vegetable fermentations*. En *Microbial fermented foods*. Ch. 2, 49-107.
- Welsh, F.W., W.D. Murray y R.E. Williams. 1989. *Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 9(2): 105-169.
- Welsh, F.W. y R.E. Williams. 1989. *Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil*. *J. Food Sci.* 54(6): 1565-1568.
- Woolford, M.K. 1985. *The silage fermentation*. En *Microbiol Ferment. Foods Vol 2*: 85-112.
- Zhang, D.X. y M. Cheryan. 1991. *Direct fermentation of starch to lactic acid by (Lactobacillus amylovorus)*. *Biotechnol. Lett.* 3(10): 733-738.